



**Juliana Meixedo
Calheiros**

**Purificação de IgY e avaliação da sua
atividade/estabilidade em soluções aquosas de
polímeros, sais e líquidos iónicos**



**Juliana Meixedo
Calheiros**

**Purificação de IgY e avaliação da sua
atividade/estabilidade em soluções aquosas de
polímeros, sais e líquidos iónicos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Mara Guadalupe Freire Martins, Investigadora Coordenadora do Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro, e coorientação do Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais e à minha irmã...

o júri

presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Mara Guadalupe Freire Martins
Investigadora Coordenadora do Departamento de Química, CICECO, Universidade de Aveiro

Doutora Fani Pereira de Sousa
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior

Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de agradecer aos meus orientadores, à Dr^a Mara Freire e ao Professor Pedro Domingues, por toda a disponibilidade e exigência que colocaram em mim, permitindo que evoluísse ao longo deste ano e que fosse possível a concretização desta dissertação de mestrado.

Agradeço também a todos os elementos do PAtH pela ajuda e incentivo ao longo desta caminhada. Um especial agradecimento à Mafalda por todo o acompanhamento, disponibilidade e partilha de conhecimento, sem esquecer a Maria João que esteve sempre presente quando necessário.

Tenho ainda a agradecer à professora Rita Ferreira, à sua aluna Rita e à Dr^a Sofia Guedes pela ajuda na execução do *Western Blot* e a amabilidade da Dr^a Isabel Correia na realização de Dicroísmo Circular.

Aos meus amigos, agradeço o apoio e os bons momentos que passamos nesta Universidade. Obrigada por tornarem tudo muito mais fácil!

À minha família, em particular aos meus pais, agradeço-vos a confiança que depositam em mim e todas as oportunidades que me proporcionam. À minha irmã, agradeço-te por seres insubstituível na minha vida...

Palavras-chave

IgY, Purificação, Sistemas Aquosos Bifásicos, Líquidos Iônicos, Polímeros, Sais, Atividade e Estabilidade de Anticorpos

Resumo

O aumento da resistência a antibióticos exige atualmente um maior esforço no desenvolvimento de terapêuticas alternativas. Os biofármacos com base em anticorpos, reconhecidos pela sua especificidade, constituem uma alternativa promissora no tratamento de infecções, bem como de cancro, alergias, doenças auto-imunes e inflamação. A imunoglobulina Y (IgY) da gema do ovo apresenta diversas vantagens relativamente à IgG de mamíferos, sendo aplicada em imunoterapia passiva, imunoprofilaxia, diagnóstico e métodos imunológicos. No entanto, as técnicas tradicionais de extração da IgY a partir da matriz lipídica que é a gema de ovo não são adequadas para a sua obtenção em grandes quantidades e com um elevado grau de pureza de um modo económico e rápido. Uma vez que a indústria farmacêutica exige que as proteínas terapêuticas apresentem um elevado grau de pureza, é necessário desenvolver novos processos eficazes e económicos que permitam a extração e purificação da IgY. Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são sistemas do tipo líquido-líquido utilizados na extração e purificação de biomoléculas. São sistemas maioritariamente constituídos por água, biocompatíveis e têm a capacidade de preservar a integridade e atividade biológica das proteínas. Na inexistência de uma técnica ideal de extração e purificação da IgY, a utilização de SABs poderá responder a esta problemática; contudo deverá avaliar-se a preservação da funcionalidade do anticorpo após o processo. Face ao exposto, o objetivo desta dissertação de mestrado consiste em extrair e purificar a IgY num único passo utilizando SABs constituídos por líquidos iónicos (LIs) e polipropileno glicol 400 g.mol⁻¹ (PPG 400). Adicionalmente, pretende-se avaliar a atividade e estabilidade da IgY em várias soluções aquosas de polímeros, sais e LIs para verificar se a técnica de purificação não compromete a funcionalidade do anticorpo.

Verificou-se que as proteínas presentes na gema de ovo apresentam uma maior afinidade para as fases enriquecidas em LIs, em detrimento das fases de PPG 400. Após optimização de várias condições, conseguiu-se alcançar uma recuperação máxima de 85 % da IgY na fase inferior dos sistemas (enriquecida em LI) com 44 % de pureza, num único passo. Relativamente à atividade e estabilidade do anticorpo em soluções aquosas de polímeros, sais e LIs não se verificaram alterações ao nível da estrutura secundária, embora possam ocorrer algumas modificações na reatividade da IgY na presença destas soluções.

Keywords

IgY, Purification, Aqueous Biphasic Systems, Ionic Liquids, Polymers, Salts, Antibodies Activity and Stability

Abstract

The increased antibiotic resistance to microorganisms requires nowadays a greater effort on the development of alternative therapeutics. Antibody-based biopharmaceuticals, recognized by their specificity, are a promising alternative used in the treatment of infections, as well as in cancer, allergies, autoimmune diseases and inflammation. The egg yolk immunoglobulin Y (IgY) has several advantages over mammalian IgG, being applied in passive immunotherapy, immunoprophylaxis, diagnostic and immunological methods. However, the traditional techniques of extraction and purification of IgY from the yolk's lipidic matrix are not suitable for obtaining large quantities of pure antibodies by an inexpensive and quick approach. Considering that the pharmaceutical industry requires pure therapeutic proteins, it is necessary the development of new economical and effective processes for the extraction and purification of IgY. Aqueous biphasic systems (ABS) are liquid-liquid systems used for the extraction and purification of biomolecules. They are mostly composed of water, are biocompatible and able to maintain the proteins integrity and biological activity. Due to the absence of an ideal technique of extraction and purification of IgY, the application of ABS can respond to this problem; however, the preservation of the antibody functionality should be evaluated after the process. In summary, the objective of this MSc thesis consists on the extraction and purification of IgY in a single step using ABS composed of ionic liquids (ILs) and polypropylene glycol 400 g.mol⁻¹ (PPG 400). Moreover, the IgY activity and stability in various aqueous solutions of polymers, salts and ILs was ascertained to verify if the purification technique does not compromise the antibody functionality.

It was found that all proteins present in egg yolk have a higher affinity to the IL-rich phases over the PPG 400 phases. After several conditions optimization, an IgY maximum recovery of 85 % in the bottom phase (IL-enriched phase) with 44 % of purity was obtained in a single step. Regarding the antibodies activity and stability in polymers, salts and ILs aqueous solutions it was not verified alterations on the secondary structure, however some modifications may occur in the reactivity of IgY in these solutions.

Índice

Lista de Tabelas	I
Lista de Figuras	III
Lista de Abreviaturas	VI
1. Introdução	1
1.1. Imunoglobulina Y (IgY).....	3
1.2. Processos de extração e purificação da IgY	8
1.2.1. Estabilidade de anticorpos associada a procedimentos de extração e purificação	8
1.2.2. Gema do ovo como matriz de purificação da IgY	11
1.2.3. Técnicas tradicionais de extração e purificação da IgY	12
1.2.4. Sistemas aquosos bifásicos (SABs).....	19
2. Secção Experimental	23
2.1. Purificação da IgY através de SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs e PPG 400..	24
2.1.1. Materiais	24
2.1.2. Procedimento experimental	25
2.1.2.1. Síntese e caracterização de [Ch][GB]-LIs	25
2.1.2.2. Purificação da IgY através de SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs, PPG 400 e FPSA.....	25
2.1.2.2.1. Determinação de Tie-lines (TLs).....	26
2.1.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	27
2.1.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	29

2.2. Avaliação da atividade e estabilidade da IgY em soluções aquosas de polímeros, sais e LIs	29
2.2.1. Materiais	29
2.2.2. Procedimento experimental	31
2.2.2.1. <i>Western Blot</i>	31
2.2.2.2. ELISA	32
2.2.2.3. Monotorização do comprimento de onda correspondente à absorvância máxima das soluções	32
2.2.2.4. Dicroísmo Circular (DC)	33
3. Resultados e Discussão	34
3.1. Purificação da IgY através de SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs + PPG 400 .35	
3.1.1. Síntese e caracterização de [Ch][GB]-LIs	35
3.1.2. SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs + PPG 400 + FPSA.....	37
3.1.2.2. SDS-PAGE	42
3.1.3. Purificação da IgY variando a concentração de [Ch][TES]	44
3.1.4. Purificação da IgY variando a concentração de [Ch][TES] e PPG 400	48
3.2. Avaliação da atividade e estabilidade da IgY em soluções aquosas de polímeros, sais e LIs	53
3.2.1. <i>Western Blot</i> da IgY em soluções de polímeros	54
3.2.2. <i>Western Blot</i> da IgY em soluções de sais	56
3.2.3. <i>Western Blot</i> da IgY em soluções de LIs.....	58
3.2.4. ELISA	60
3.2.5. Monotorização do comprimento de onda correspondente à absorvância máxima das soluções	64
3.2.6. Dicroísmo Circular (DC)	68

3.3. Conclusões	73
4. Considerações finais	75
5. Referências	78

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais aplicações da IgY e respectivos efeitos.....	5
Tabela 2 - Composição química da gema do ovo e respectivas percentagens relativas. Adaptado de Kovacs-Nolan e Mine [12]......	12
Tabela 3 - Comparação das técnicas utilizadas no âmbito da extração e purificação da IgY, em termos de rendimento/recuperação e pureza.....	18
Tabela 4 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos SABs constituídos por 7-10 % [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG 400 + 40-43 % FPSA a 25 °C. As composições iniciais das misturas são representadas por $[PPG]_M$ e $[LI]_M$, enquanto que $[PPG]_{PPG}$ e $[PPG]_{LI}$ representam a fração mássica de PPG 400 nas fases maioritariamente constituída por PPG 400 e LI, respetivamente; e $[LI]_{LI}$ e $[LI]_{PPG}$ representam a fração mássica de LI nas fases maioritariamente constituída por LI e PPG, respetivamente.....	37
Tabela 5 - Coeficiente de partição (K_{IgY}), eficiência de extração ($EE_{IgY}(\%)$), pureza ($Pureza_{IgY}(\%)$) e rendimento ($Rendimento_{IgY}(\%)$) da IgY nas fases inferiores dos SABs constituídos por 7-10 % [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG 400 + 40-43 % FPSA a 25 °C.....	40
Tabela 6 - Valores de pH das fases dos SABs constituídos por 7-10 % [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG 400 + 40-43 % FPSA.....	43
Tabela 7 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos SABs constituídos por [Ch][TES] + PPG 400 a 25 °C. As composições iniciais das misturas são representadas por $[PPG]_M$ e $[LI]_M$, enquanto que $[PPG]_{PPG}$ e $[PPG]_{LI}$ representam a fração mássica de PPG 400 na fase maioritariamente constituída por PPG 400 e LI, respetivamente; e $[LI]_{LI}$ e $[LI]_{PPG}$ representam a fração mássica de LI na fase maioritariamente constituída por LI e PPG, respetivamente.....	45
Tabela 8 - Coeficiente de partição (K_{IgY}), eficiência de extração ($EE_{IgY}(\%)$), pureza ($Pureza_{IgY}(\%)$) e rendimento ($Rendimento_{IgY}(\%)$) da IgY nas fases inferiores dos SABs constituídos por 10-20 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 30-40 % FPSA a 25 °C.....	46
Tabela 9 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos SABs constituídos por [Ch][TES] + PPG 400 a 25 °C. As composições iniciais das misturas são representadas por $[PPG]_M$ e $[LI]_M$, enquanto que $[PPG]_{PPG}$ e $[PPG]_{LI}$ representam a fração mássica de PPG 400 na fase maioritariamente constituída por PPG 400 e LI, respetivamente; e $[LI]_{LI}$ e $[LI]_{PPG}$ representam a fração mássica de LI na fase maioritariamente constituída por LI e PPG,	

respetivamente.	49
Tabela 10 - Coeficiente de partição (K_{IgY}), eficiência de extração (EE_{IgY} (%)), pureza ($Pureza_{IgY}$ (%)) e rendimento ($Rendimento_{IgY}$ (%)) da IgY nas fases inferiores dos SABs constituídos por 10 e 16 % [Ch][TES] + 30-45 % PPG 400 + 39-54 % FPSA a 25 °C.	50
Tabela 11 - Registo dos valores dos comprimentos de onda correspondentes ao máximo de absorvância no intervalo 260-300 nm da IgY nas soluções de polímeros, sais e LIs.	67
Tabela 12 - Resumo dos resultados obtidos no âmbito da avaliação da atividade e estabilidade da IgY em soluções de polímeros, sais e LIs.	72

Lista de Figuras

- Figura 1** - Estrutura geral de um anticorpo. Adaptado de Wang *et al.* [5]. V – Domínio variável, da cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH); C – Domínio constante, da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH); os pontos a negro simbolizam as cadeias de hidratos de carbono. 6
- Figura 2** - Esquematisação das diferenças estruturais entre a IgY (à esquerda) e a IgG (à direita). Adaptado de Warr *et al.* [38]. V – Domínio variável, da cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH); C – Domínio constante, da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (Cv ou C γ); os pontos a negro simbolizam as cadeias de hidratos de carbono; as pontes dissulfureto são representadas pelas linhas que ligam as duas cadeiras. 7
- Figura 3** - Diagrama de fases de um SAB constituído por PPG e LI. Adaptado de Raja *et al.* [45]. SCI – curva binodal; PC – ponto crítico; SI - *tie-line*; S – composição da fase superior; I - composição da fase inferior; X, Y e Z - composição das misturas na região bifásica.... 20
- Figura 4** - Estrutura de [Ch][GB]-LIs, líquidos iônicos constituídos pelo catião colínio e aniões derivados de *Good's Buffers* (Tricine, TES, MES e HEPES). Adaptado de Taha *et al.* [89]. 21
- Figura 5** - Reta de calibração utilizada para determinar a concentração de IgY, com base nas áreas dos picos obtidos nos cromatogramas ($\lambda=280$ nm) em função da concentração dos padrões de IgY pura..... 28
- Figura 6** - Esquematisação das vias de síntese dos [Ch][GB]-LIs utilizados no âmbito da purificação da IgY, e numeração dos átomos de carbono. 36
- Figura 7** - Diagrama de fases do SAB constituído por [Ch][Tricine] + PPG 400 + H₂O: ajuste dos dados experimentais da curva binodal através da equação 1 (—), dados experimentais da curva binodal (■) [89] e dados experimentais das TLs (▲). 38
- Figura 8** - Cromatogramas resultantes da análise por SE-HPLC (absorvância a 280 nm em função do tempo em minutos) da FPSA e das fases dos SABs constituídos por 8,5 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 41,5 % FPSA: fase superior (—), fase inferior (—) e FPSA inicial (—), com a identificação das três principais proteínas presentes na FPSA: IgY aos 15 minutos, α -livetina aos 17 minutos e β -livetina aos 18 minutos. 39
- Figura 9** - SDS-PAGE em condições semi-nativas corado com azul de Coomassie, realizado após a purificação da IgY com SABs constituídos por 7-10 % [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG

400 + 40-43 % FPSA.....	42
Figura 10 - Diagrama de fases identificando os pontos de mistura a estudar (●), nomeadamente a 10-20 % [Ch][TES], 50 % PPG 400 e 30-40 % FPSA.....	44
Figura 11 - SDS-PAGE em condições semi-nativas corado com azul de Coomassie, realizado após a purificação da IgY com SABs constituídos por 10-20 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 30-40 % FPSA.	47
Figura 12 - Diagrama de fases identificando os pontos de mistura a estudar (●), nomeadamente a 10 e 16 % [Ch][TES] + 30-45 % PPG 400 + 39-54 % FPSA.	48
Figura 13 - SDS-PAGE em condições semi-nativas corado com azul de Coomassie, realizado após a purificação da IgY com SABs constituídos por 10 e 16 % [Ch][TES] + 30-45 % PPG 400 + 39-54 % FPSA	51
Figura 14 - <i>Western Blot</i> da IgY em soluções de polímeros, obtido a partir da transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE realizado em condições desnaturantes.	54
Figura 15 - SDS-PAGE em condições desnaturantes realizado com a IgY em várias soluções de polímeros para controlo do <i>Western Blot</i>	55
Figura 16 - Estruturas químicas do PPG (à esquerda) e do PEG (à direita).....	55
Figura 17 - <i>Western Blot</i> da IgY em soluções de sais, obtido a partir da transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE realizado em condições desnaturantes.	56
Figura 18 - SDS-PAGE em condições desnaturantes realizado com a IgY em várias soluções de sais para controlo do <i>Western Blot</i>	57
Figura 19 - <i>Western Blot</i> da IgY em soluções de LIs, obtido a partir da transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE realizado em condições desnaturantes.	58
Figura 20 - SDS-PAGE em condições desnaturantes realizado com a IgY em várias soluções de LIs para controlo do <i>Western Blot</i>	59
Figura 21 - Representação das estruturas dos LIs [C ₄ mim][CF ₃ SO ₃], [C ₄ mim]Cl, [Ch][Ac] e [N ₄₄₄₄]Cl.....	60
Figura 22 - Curva de calibração ajustada aos valores de absorvância a 450 nm em função da concentração dos padrões (6,25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL).	61
Figura 23 - Representação gráfica dos valores de concentração de IgY reconhecida em soluções aquosas de polímeros.....	61
Figura 24 - Representação gráfica dos valores de concentração de IgY reconhecida em	

soluções aquosas de sais.....	62
Figura 25 - Representação gráfica dos valores de concentração de IgY reconhecida em soluções aquosas de LIs.....	62
Figura 26 - Espectro na região 200-400 nm da IgY em várias soluções de polímeros: PPG 400 5% (—), PPG 400 15% (—), PPG 400 25% (—), PEG 200 5% (—), PEG 200 15% (—), PEG 200 25% (—), PEG 400 5% (—), PEG 400 15% (—), PEG 400 25% (—), PEG 600 5% (—), PEG 600 15% (—) e PEG 600 25% (—).	65
Figura 27 - Espectro na região 200-400 nm da IgY em várias soluções de sais: cloreto de sódio 5% (—), sulfato de sódio 5% (—), sulfato de sódio 10% (—), carbonato de sódio 5% (—), citrato de sódio 5% (—), citrato de sódio 15% (—) e fosfato de sódio 5% (—).....	65
Figura 28 - Espectros na região 200-400 nm da IgY em várias soluções de LIs: [Ch][MES] 5% (—), [Ch][MES] 15% (—), [Ch][MES] 25% (—), [Ch][TES] 5% (—), [Ch][TES] 15% (—), [Ch][TES] 25% (—), [Ch][Tricine] 5% (—), [Ch][Tricine] 15% (—), [Ch][Tricine] 25% (—), [Ch][HEPES] 5% (—), [Ch][HEPES] 15% (—), [Ch][HEPES] 25% (—), [C ₄ mim]Cl 5% (—), [C ₄ mim]Cl 15% (—), [C ₄ mim]Cl 25% (—), [C ₄ mim][CF ₃ SO ₃] 5% (—), [C ₄ mim][CF ₃ SO ₃] 15% (—), [C ₄ mim][CF ₃ SO ₃] 25% (—), [Ch][Ac] 5% (—), [Ch][Ac] 15% (—), [Ch][Ac] 25% (—), [N ₄₄₄₄]Cl 5% (—), [N ₄₄₄₄]Cl 15% (—) e [N ₄₄₄₄]Cl 25% (—).	66
Figura 29 - Espectro de DC representativo de proteínas constituídas por α -hélices (curva 1), folhas β (curva 2) e conformação desenovelada (curva 3). Adaptado de Greenfield <i>et al.</i> [50].	68
Figura 30 - Espectro de DC da IgY em soluções de polímeros: PEG 200 5 % (—), PEG 200 15 % (—), PEG 200 25 % (—), PEG 400 5% (—), PEG 400 15% (—), PEG 400 25% (—), PEG 600 5% (—), PEG 600 15% (—), PEG 600 25% (—), PPG 400 5% (—), PPG 400 15% (—), utilizando como controlo a IgY em PBS (—).	69
Figura 31 - Espectro de DC da IgY em soluções de sais: fosfato de sódio 5% (—), sulfato de sódio 5% (—) e 10% (—), utilizando como controlo a IgY em PBS (—).	69
Figura 32 - Espectro de DC da IgY em soluções de [N ₄₄₄₄]Cl 5% (—), 15% (—) e 25% (—), utilizando como controlo a IgY em PBS (—).	70

Lista de Abreviaturas

[C₄mim][CF₃SO₃] - Triflato de 1-butil-3-metilimidazólio

[C₄mim]Cl - Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio

[Ch][Ac] - Acetato de colínio

[N₄₄₄₄]Cl - Cloreto de tetrabutilamónio

C - Domínio constante

Ch - Colínio

DC - Dicroísmo Circular

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fab - *Fragment antigen-binding*

Fc - *Fragment crystallizable*

FPsa - Fração das proteínas solúveis em água

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

GBs - *Good's Buffers*

H - Cadeia pesada

HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanossulfónico

I - Fase inferior

IgG - Imunoglobulina G

IgY - Imunoglobulina Y

L - Cadeia leve

LIs - Líquidos iónicos

MES - Ácido 2-(N-morfolino) etanossulfónico

PC - Ponto crítico

PEG - Polietileno glicol

pI - Ponto isoelétrico

PPG - Polipropileno glicol

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

S - Fase superior

SABs - Sistemas Aquosos Bifásicos

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SE-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Exclusão Molecular

TBS-T - *Tris-Buffered Saline-Tween 20*

TES - Ácido 2-[[1,3-di-hidroxi-2-(hidroximetil) propan-2-il] amino] etanossulfónico

TL - *Tie-line*

TLL - *Tie-line length*

TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

Tricine - N-(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil) glicina

TSP - Trimetilsilil propionato

UV - Ultravioleta

V - Domínio variável

1. Introdução

O crescente aumento de microorganismos resistentes a antibióticos, a diminuição da eficácia dos mesmos e o aumento do número de indivíduos imunocomprometidos que não respondem aos tratamentos tradicionais são fatores que apresentam atualmente um elevado impacto na saúde e economia [1,2]. Por estes motivos, existe uma maior necessidade de recorrer a terapias alternativas, como por exemplo, utilizando biofármacos. Os biofármacos podem ser baseados em proteínas ou ácidos nucleicos, apresentando princípios ativos de origem biológica ou são fabricados utilizando métodos biotecnológicos, sendo utilizados para fins terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico *in vivo* [3].

As proteínas são cada vez mais alvo de estudo em aplicações terapêuticas e de diagnóstico (revisto em [4]). Em particular, as terapias com base em anticorpos são importantes, uma vez que são específicas (contribuindo para menos efeitos secundários) e possibilitam a conjugação dos anticorpos com outras entidades terapêuticas, aumentando assim a eficiência do tratamento (revisto em [5]). Os anticorpos são utilizados no tratamento de inúmeras patologias, tais como o cancro, doenças infecciosas, alergias, doenças auto-imunes e inflamação (revisto em [5,6]). A imunoglobulina G (IgG) tem sido o anticorpo de eleição para as aplicações terapêuticas descritas anteriormente; no entanto, a imunoglobulina Y (IgY) presente na gema do ovo apresenta uma série de vantagens sobre a IgG, nomeadamente o facto de não se ligar a fatores reumatoídes nem ativar o sistema complemento, e desta forma poderá atuar como uma alternativa à IgG de mamíferos [7–9].

Uma vez que a IgY pode ser obtida em grandes quantidades de um modo económico, o interesse na utilização de anticorpos da gema de ovo (IgY) para fins terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico tem aumentado, tal como será descrito na introdução deste trabalho. Existem várias técnicas que permitem a extração e purificação da IgY, nomeadamente técnicas de precipitação com polímeros, sais, solventes orgânicos e polissacarídeos aniónicos, métodos cromatográficos e sistemas aquosos bifásicos (SABs), que serão também apresentados e descritos. As técnicas tradicionais de extração e purificação da IgY, maioritariamente recorrendo a colunas cromatográficas, dificilmente permitem a obtenção da IgY em grandes quantidades de modo económico e rápido. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de plataformas alternativas e mais eficientes para a purificação da IgY (revisto em [4,6]). Os SABs permitem extrações do tipo líquido-líquido e, por sua vez, a purificação de biomoléculas. Estes sistemas apresentam ainda uma série de vantagens em relação às técnicas de purificação tradicionais, nomeadamente a facilidade em

aplicá-los em larga escala, a biocompatibilidade conferida por serem constituídos maioritariamente por água e a capacidade de manterem a integridade das proteínas e a sua atividade biológica [10,11].

1.1. Imunoglobulina Y (IgY)

A IgY, também designada de γ -livetina, é o anticorpo que se encontra presente em maior quantidade na gema do ovo de aves (revisto em [12]). Os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas produzidas durante a resposta imune humoral por uma classe de linfócitos B designada de plasmócitos (revisto em [13]). A IgY pode atuar como uma alternativa aos anticorpos de mamíferos (nomeadamente em relação à IgG) para diversas aplicações, nomeadamente para imunoterapia passiva. A importância da IgY deve-se ao facto de que a administração terapêutica deste anticorpo pode reduzir a utilização de antibióticos e evitar fenómenos de resistência, uma vez que apresenta efeitos significativos no tratamento de infeções por bactérias resistentes [14–18]. A possibilidade da administração oral da IgY tem-se tornado bastante atrativa, em detrimento da administração intravenosa (revisto em [19]). Todavia, a IgY apresenta a desvantagem de não preservar totalmente a sua atividade perante as condições acídicas do trato gastrointestinal. No entanto, já existem alternativas à base de encapsulamento para evitar a proteólise gástrica [20].

O estudo da extração e purificação de anticorpos policlonais para utilização em seres humanos encontra-se essencialmente centrado em mamíferos de pequeno porte, tais como, ratos e coelhos (revisto em [21]). A obtenção de anticorpos de mamíferos imunizados contra determinado antígeno é realizada pela recolha do sangue do animal e centrifugação após alguns dias. Este processo permite obter 200 mg IgG/40 mL sangue, contudo ainda apresenta um elevado custo e tem a desvantagem de recorrer a práticas invasivas [22]. Em contraste, a obtenção de anticorpos de aves é realizada de modo mais simples e não invasivo, pela colheita dos ovos [23]. O processo inicia-se com a imunização de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) com antígenos patogénicos, ocorrendo a transferência da IgY em quantidades elevadas (100-150 mg IgY/gema) do soro materno para a gema do ovo [22,24–26].

Contrariamente à IgG, a IgY não se liga aos fatores reumatoides (autoanticorpos que se ligam à região Fc da IgG), permitindo que não ocorram reações cruzadas com a IgG de mamíferos e evitam reações inespecíficas nos testes imunológicos [7,8]. A IgY apresenta ainda a vantagem de não ativar o sistema complemento de mamíferos, uma vez que o

componente C4 ativado pode ligar-se ao fragmento Fab da IgG, interferindo na ligação com o antígeno [9]. Para além da imunoterapia passiva, a IgY apresenta outras potenciais aplicações, nomeadamente para fins imunoproláticos, diagnóstico e métodos imunológicos. No âmbito da imunoterapia, a IgY demonstrou ser vantajosa no tratamento de infeções bacterianas e virais, visto que com a sua utilização os episódios de diarreia diminuem e aumenta a percentagem de sobrevivência, podendo ser utilizada no ramo da veterinária [14–17,27–31]. A IgY é eficazmente aplicada no tratamento de infeções provocadas por bactérias Gram-negativas, sendo que estudos *in vitro* revelam que a IgY tem a capacidade de suprimir a adesão das bactérias ao epitélio intestinal (possivelmente atuando ao nível das fímbrias) [16]. A diminuição da carga viral ainda não se encontra completamente esclarecida, contudo a IgY demonstrou-se eficaz no combate a infeções provocadas por vírus que se multiplicam no intestino (coronavírus e rotavírus). Desta forma, supõe-se que a IgY tenha a capacidade de diminuição da replicação viral ao nível do epitélio intestinal [30]. A IgY é ainda passível de conferir proteção imunoprolática, uma vez que em pacientes com fibrose cística, a administração da IgY anti-*Pseudomonas aeruginosa* permitiu uma redução dos episódios de infeção pela bactéria durante os 12 anos de estudo [18]. Em diagnóstico, particularmente no caso de cancro, demonstrou já ser um anticorpo que permite a deteção de marcadores tumorais [32–34]. Isto é possível através da imunização de galinhas com as proteínas alvo, ocorrendo a formação da IgY com uma elevada afinidade para as mesmas proteínas. Após a purificação da IgY presente na gema do ovo, esta revelou-se eficaz na deteção dessas proteínas a nível celular [33]. A IgY pode ainda ser utilizada em métodos imunológicos, nomeadamente em imunofluorescência [35] e radioimunoensaios [36]. A Tabela 1 apresenta um resumo das principais aplicações da IgY.

Tabela 1 - Principais aplicações da IgY e respetivos efeitos.

Aplicação	Alvo de estudo	Patologia/agente infeccioso	Efeito(s) da IgY	Referência
Terapêutica	Coelho	Gastroenterite por <i>E.Coli</i> enterotoxigénica	Diminui os episódios de diarreia	[14]
	Rato	Salmonelose por <i>Salmonella enteritidis</i>	Maior percentagem de sobrevivência	[15]
	Rato	Rotavírus	Diminui os episódios de diarreia	[27]
	Rato	Rotavírus	Proteção contra a diarreia	[28]
	Porco	Colibacilose por <i>E.Coli</i> enterotoxigénica	Permite uma rápida consistência fecal normal; Com maiores quantidades de anticorpo, a eliminação da bactéria do trato gastrointestinal é mais rápida	[16]
	Vaca	Coronavírus	Maior percentagem de sobrevivência e aumento de peso	[30]
	Vaca	Rotavírus	Aumento de peso e diminuição da carga viral	[29]
	Galinha	<i>Salmonella enteritidis</i>	Diminui o número de ovos infetados pela bactéria	[17]
Imunoprolática Oral	Truta	<i>Yersinia ruckeri</i>	Menor percentagem de mortalidade	[31]
	Humanos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> em pacientes com fibrose cística	Redução dos episódios de infeção pela bactéria durante 12 anos	[18]
Diagnóstico	CD87 nas células tumorais	Cancro gástrico	Identificação pelo anticorpo de galinha HU277	[32]
	Recetor do fator de crescimento II/Manose 6-fosfato	Cancro da mama e ovário	Ligar ao recetor do fator de crescimento II/Manose 6-fosfato	[33]
	Psoriasina	Cancro da mama	Ligar à psoriasina	[34]
Métodos imunológicos	IgY marcada com isotiocianato de fluoresceína	Vírus influenza	Imunofluorescência com identificação de células infetadas com vírus influenza	[35]
	Prostaglandinas	---	Formação de anticorpos específicos com ligação às prostaglandinas para utilização em radioimunoensaios	[36]

A estrutura dos anticorpos é bastante similar, sendo estes constituídos por quatro subunidades: duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H). Estas estão ligadas por pontes dissulfureto inter-cadeias originando uma região flexível (*hinge*). Os anticorpos possuem ainda hidratos de carbono ligados covalentemente às cadeias H. Nos anticorpos existem dois domínios distintos: um domínio variável (V) na região do N-terminal, onde ocorre a ligação ao antígeno, e um domínio constante (C), na cauda do anticorpo, que ativa o sistema complemento e auxilia no recrutamento de fagócitos (revisto em [5,37]). Os dois locais idênticos de ligação ao antígeno no domínio V constituem o Fab (*fragment antigen-binding*), enquanto que o domínio C na cauda do anticorpo designa-se por Fc (*fragment crystalizable*) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura geral de um anticorpo. Adaptado de Wang *et al.* [5]. V – Domínio variável, da cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH); C – Domínio constante, da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH); os pontos a negro simbolizam as cadeias de hidratos de carbono.

A IgY é uma proteína hidrossolúvel que apresenta um peso molecular total de 180 kDa, maior do que o da IgG (150 kDa). A diferença de peso molecular deve-se ao facto de

a IgY possuir quatro domínios CH (Cv1, Cv2, Cv3, Cv4) enquanto que a IgG possui apenas três (C γ 1, C γ 2, C γ 3), conferindo-lhe uma maior hidrofobicidade (revisto em [12,38]) (Figura 2).

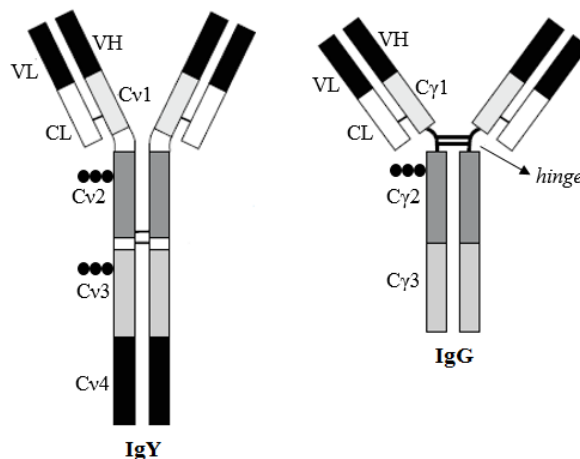


Figura 2 - Esquematisação das diferenças estruturais entre a IgY (à esquerda) e a IgG (à direita). Adaptado de Warr *et al.* [38]. V – Domínio variável, da cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH); C – Domínio constante, da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (Cv ou C γ); os pontos a negro simbolizam as cadeias de hidratos de carbono; as pontes dissulfureto são representadas pelas linhas que ligam as duas cadeiras.

Na IgG, o domínio C γ 1 encontra-se separado do domínio C γ 2 pela região *hinge*, conferindo flexibilidade ao fragmento Fab. No caso da IgY, não existe uma região *hinge* que confira flexibilidade. A ausência da região *hinge* e uma menor conformação em folha β na IgY podem ser fatores indicativos de uma menor estabilidade do anticorpo [39]. Pela comparação das sequências das duas imunoglobulinas, demonstrou-se que a C γ 2 e C γ 3 da IgG são bastante semelhantes aos domínios Cv3 e Cv4 da IgY, contudo o Cv2 da IgY não apresenta nenhuma região equivalente na IgG (revisto em [38]).

O ponto isoelétrico da IgY é 5,7-7,6, sendo menor do que o da IgG [40]. A estabilidade das imunoglobulinas perante condições alcalinas é bastante semelhante, perdendo a estabilidade acima de pH 12. No entanto, perante condições ácidas, a IgY demonstra ser mais sensível do que a IgG, perdendo atividade a pH 3 [39]. A IgY demonstrou também ser mais sensível à temperatura do que a IgG, uma vez que a temperatura correspondente ao máximo de desnaturação ocorre aos 73,9°C para a IgY e aos 77,0°C para a IgG [41]. As imunoglobulinas são ainda suscetíveis à digestão proteica. A IgY e a IgG apresentam uma resistência considerável à digestão com tripsina e quimotripsina, contudo são sensíveis à digestão com pepsina [42]. A IgY não tem ainda a capacidade de ligação à

proteína A de *Staphylococcus* ou à proteína G de *Streptococcus*, impossibilitando a realização de cromatografia de afinidade com estes ligandos, o método de eleição utilizado para a purificação de IgG (revisto em [43,44]).

1.2. Processos de extração e purificação da IgY

As técnicas de extração e purificação tradicionais de proteínas exigem várias etapas geralmente dispendiosas com consequente perda da proteína de interesse. No entanto, os objetivos destas técnicas visam sempre obter o máximo de pureza e atividade do produto final, com o menor custo possível (revisto em [45]). Assim sendo, é necessária a avaliação da atividade e estabilidade da proteína após qualquer processo de extração ou purificação. A presença de ligações dissulfureto e interações intra-domínios nos anticorpos confere-lhes uma maior estabilidade e resistência térmica comparativamente a outras proteínas (revisto em [5]). No entanto, podem ocorrer processos como a desnaturação, isomerização, oxidação, fragmentação, agregação e desaminação que levam a que a função do anticorpo fique comprometida (revisto em [5]). Estes processos estão frequentemente associados às propriedades das soluções em que os anticorpos se encontram, como se descreve em seguida.

1.2.1. Estabilidade de anticorpos associada a procedimentos de extração e purificação

O pH é um fator crucial na estabilidade dos anticorpos, uma vez que afeta a solubilidade e as cargas da proteína e consequentemente as interações eletrostáticas. Quando os anticorpos se encontram com uma quantidade igual de cargas positivas e negativas, o pH aproxima-se do ponto isoelétrico (pI) da proteína e as interações anticorpo-anticorpo são favorecidas, promovendo-se a agregação (revisto em [46]). As imunoglobulinas possuem especial tendência para formar agregados, que apresentam geralmente uma atividade reduzida e uma elevada imunogenicidade, devido à multiplicidade de epítomos e/ou alterações conformacionais, estando, por exemplo, associados a falha renal e reações anafiláticas [5,47].

Os eletrólitos modulam a intensidade das interações eletrostáticas entre grupos carregados, afetando a estabilidade conformacional e a taxa de agregação de proteínas. As soluções tampão têm uma força iónica associada, sendo que geralmente uma elevada força iónica acelera o processo de agregação (revisto em [46]). A elevada concentração de anticorpos promove também a aglomeração macromolecular e está geralmente associada a

agregação (revisto em [48]). Existem ainda agentes estabilizantes, como é o caso da sacarose, que é preferencialmente excluída da superfície do anticorpo promovendo as interações da proteína com o solvente [49].

Os ciclos de congelamento/descongelamento também induzem instabilidade nos anticorpos, uma vez que a desnaturação a temperatura reduzida aumenta a solubilidade dos resíduos hidrofóbicos e, se ocorrer cristalização dos sais do tampão, pode causar alteração no valor de pH (revisto em [48]). Por outro lado, as elevadas temperaturas perturbam a conformação do anticorpo, expondo as regiões hidrofóbicas e acelerando as reações químicas, promovendo a oxidação, desaminação, desnaturação e possivelmente a agregação (revisto em [46,48]). O estudo da estrutura secundária e enovelamento das proteínas pode ser realizado recorrendo a técnicas como Dicroísmo Circular (DC), permitindo inferir sobre a estabilidade dos anticorpos [50]. Pode-se ainda monitorizar os valores de absorvância e comprimentos de onda na região dos 280 nm, uma vez que desvios significativos a este comprimento de onda poderão significar alterações na estrutura terciária da proteína [51,52]. A avaliação da preservação da função e atividade de um anticorpo pode ser realizada através de técnicas baseadas no reconhecimento do antígeno pelo anticorpo, tais como *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Western Blot* [53,54].

Com o objetivo de avaliar os processos que causam instabilidade nos anticorpos, de modo a minimizá-los nos procedimentos de extração e purificação, apresenta-se de seguida os resultados de alguns estudos. Szenczi *et al.* [55] observaram uma diminuição da estabilidade conformacional da IgG com o decréscimo do pH, estando ainda associado um aumento da resistência à agregação. Relativamente à estabilidade térmica, a dimerização aumenta quando o anticorpo é armazenado a 5°C; contudo, este efeito é parcialmente revertido quando os anticorpos são incubados posteriormente a 37°C. Verifica-se ainda que temperaturas da ordem dos 70°C induzem agregação, sendo que este efeito desestabilizador é favorecido quando as concentrações do anticorpo são elevadas. A IgG demonstrou uma elevada estabilidade a pH 7; contudo, a tendência à agregação aumenta quando o pH se aproxima do pI do anticorpo (4,7-7,5). O espectro de DC revela uma banda negativa a 217 nm, característica da conformação em folha β , bem como bandas positivas e negativas na região próxima ao UV. A pH 6, a IgG encontra-se maioritariamente com uma estrutura secundária compacta, sendo que este valor de pH demonstra ser o mais apropriado quando considerados os efeitos da precipitação e a estabilidade conformacional. A este valor de pH,

a adição de glucose, sorbitol ou leucina a 1% à solução de IgG retarda o processo de agregação, estabilizando a estrutura terciária da imunoglobulina [55].

Paborji *et al.* [56] verificaram fragmentação e agregação a 30-60°C no anticorpo quimérico L6 de rato (pI 9,5-10,5), bem como instabilidade após múltiplos processos de congelamento/descongelamento. No entanto, a concentração de NaCl, de anticorpo e de tampão fosfato não afetaram a estabilidade do anticorpo a pH 7,1-7,2 a 30-50°C. Para avaliar a estabilidade após o armazenamento, o anticorpo foi incubado durante 18 meses a 2-8°C, tendo-se verificado uma perda monomérica inferior a 2%, avaliada por cromatografia de exclusão molecular. O anticorpo foi ainda sujeito a agitação à temperatura ambiente durante 24 horas, não ocorrendo agregação nem degradação. Foi ainda congelado (a -20°C) e descongelado a diferentes valores de pH, revelando uma dependência significativa do pH na agregação após 35 ciclos de congelamento/descongelamento. Tendo em conta a influência da temperatura e os processos de congelamento/descongelamento, o pH ótimo do anticorpo demonstrou ser a 5,5 [56].

Usami *et al.* [57] estudaram a estabilidade do anticorpo C23 desenvolvido contra o citomegalovírus durante 14 dias em tampão (acetato, borato e fosfato), no intervalo de pH 4-10 e em diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio a 8°C e 37°C. Em meios alcalinos e oxidativos, verificou-se a diminuição da capacidade de neutralização do vírus. A pH ácido verificou-se fragmentação, enquanto que a pH alcalino verificou-se fragmentação, desaminação e agregação. A instabilidade do anticorpo foi ainda mais acentuada a 37°C do que a 8°C e na presença de peróxido de hidrogénio verificou-se oxidação, fragmentação, ligações covalentes cruzadas e agregação [57].

Desai *et al.* [58] avaliaram a estabilidade da rubisco, comparativamente à BSA e IgG1 em soluções aquosas de líquidos iónicos (*Iolilyte* 221PG e *Cyphos* 108) no intervalo de pH 6-8. Não se verificou fragmentação nem agregação numa solução aquosa de 10% de líquido iónico, embora a 50% do líquido iónico os autores tenham verificado agregação nas três proteínas [58].

Num estudo prévio realizado por Shimizu *et al.* [39], constatou-se que temperaturas superiores a 73,9°C e valores de pH abaixo de 3 comprometem a estabilidade da IgY. Posteriormente, os mesmos autores [59] verificaram uma reversão no processo de desnaturação pela adição de 30-50% de sacarose a uma solução de IgY termicamente desnaturada a 75-80°C. Por exemplo, após desnaturação térmica a 80°C, a adição de 50% de

sacarose permite que a atividade da IgY atinja quase os 100%. A inativação da IgY induzida por condições ácidas (pH 3) é também suprimida pela adição de elevadas concentrações de açúcares. A pH 7, a IgY encontra-se estável independentemente da concentração de açúcar adicionada, embora a atividade do anticorpo diminua após 3 semanas de incubação a 50°C [59].

Conclui-se que para minimizar os processos de instabilidade nos anticorpos deve-se monitorizar o pH, evitando valores próximos ao pI do anticorpo [55] ou valores muito extremos [59], uma vez que pode promover desnaturação e agregação. A temperatura, geralmente elevada (na ordem dos 70°C) promove também a agregação [39,57]. Deve-se evitar os processos de congelamento/descongelamento e longos períodos de armazenamento, uma vez que conferem instabilidade e perdas monoméricas [56]. Também a utilização de elevadas concentrações de anticorpo e de líquidos iônicos podem promover a agregação [55,58]. Caso ocorra desnaturação térmica ou desnaturação por condições ácidas, pode-se utilizar açúcares para reverter este processo [55,59].

1.2.2. Gema do ovo como matriz de purificação da IgY

Para que a IgY possa ser utilizada em seres humanos, é necessário garantir um elevado grau de pureza. A Organização Mundial de Saúde recomenda a validação das proteínas terapêuticas através de testes químicos e imunológicos após os processos de purificação, bem como após o armazenamento. O objetivo da validação é verificar a possível existência de contaminação (de origem microbiológica, proteica, com ácidos nucleicos ou com os agentes de purificação utilizados) e avaliar o grau de fragmentação e agregação do anticorpo (mais de 95% deve estar na forma de monómeros ou dímeros) e a sua imunoreatividade [60].

Atualmente, o processo de purificação da IgY continua a ser dispendioso, reforçando o desenvolvimento de técnicas alternativas económicas e eficazes que permitam a sua purificação a partir da gema de ovo (revisto em [4,6]). As técnicas tradicionais de extração e purificação da IgY têm como princípio a diluição da gema em água [54,61], interação com determinados agentes químicos (ácido caprílico [53], ácido fosfotúngstico [62] ou polissacarídeos aniônicos [61,63,64]), cromatografia [54,65,66] ou precipitação [23,67–69]. A precipitação de proteínas pode ser provocada pela ação de solventes orgânicos como o etanol, butanol, metanol e acetona, que contêm domínios polares que interagem com os

domínios da proteína induzindo a sua precipitação. Para além dos solventes orgânicos, a precipitação de proteínas pode também ser provocada pela ação de sais (NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄), polímeros (por exemplo, o polietileno glicol (PEG)) [70,71] ou pode induzir-se a precipitação por alterações de pH de modo a atingir o ponto isoelétrico da proteína [72].

A gema do ovo é constituída predominantemente por uma elevada fração de lípidos e proteínas (Tabela 2), o que por sua vez dificulta a purificação da IgY [63]. A fração lipídica da gema corresponde aos triglicéridos, fosfolípidos, colesterol e lipoproteínas. Através da remoção das lipoproteínas, por centrifugação, é possível obter o sobrenadante constituído pela fração das proteínas solúveis em água (FPSA). A FPSA da gema do ovo é uma fração composta por cerca de 78% da fração proteica da gema. Contém γ -livetina (IgY), α -livetina (albumina sérica de aves) e β -livetina (α_2 -glicoproteína) [73].

Tabela 2 - Composição química da gema do ovo e respetivas percentagens relativas. Adaptado de Kovacs-Nolan e Mine [12].

Constituinte	% (m/v)	Principais componentes (% relativa)
Proteínas	15,7-16,6	Apovitelina (37,3%) Apoproteínas lipovitelinas (40,0%) α -lipovitelina β -lipovitelina Livetinas (9,3%) α -livetina (albumina sérica) β -livetina (α_2 -glicoproteína) γ -livetina (γ -globulina) Fosvitina (13,4%) Proteína de ligação à biotina (vestígios)
Lípidos	32,0-35,0	Triacilglicerol (66%) Fosfatidilcolina (24%) Fosfatidiletanolamina (2,8%) Lisofosfatidilcolina (0,6%) Esfingomielina (0,6%) Colesterol (5,0%) Outros (1,0%)
Hidratos de carbono	0,2-1,0	
Outros	1,1	

1.2.3. Técnicas tradicionais de extração e purificação da IgY

Têm sido descritas várias técnicas de extração e purificação da IgY, considerando as técnicas de extração como aquelas que permitem o isolamento da IgY da gema (pela eliminação das lipoproteínas) e as técnicas de purificação como aquelas que permitem obter

a IgY a partir da FPSA (pela eliminação das proteínas contaminantes) [74]. Geralmente, para se obter um elevado grau de pureza conjugam-se vários procedimentos. Polson *et al.* [23] desenvolveram o estudo pioneiro no âmbito da extração e purificação da IgY presente na gema, utilizando PEG 6000 a 3,5% (m/v) em solução aquosa. A gema foi colocada em tampão fosfato e adicionou-se o polímero. Através de centrifugação, ocorreu a formação de três fases: uma fase amarelada lipídica à superfície; uma fase límpida correspondente ao sobrenadante; e uma fase semi-sólida. A percentagem de PEG no sobrenadante foi posteriormente ajustada a 12%, verificando-se a precipitação das livetinas, que foram novamente centrifugadas e precipitadas com PEG, obtendo-se 6-12 mg/mL de proteína. A IgY precipitada foi posteriormente redissolvida em tampão fosfato, permitindo a sua recuperação [23]. Mais tarde, os autores reformularam o método anteriormente descrito aumentando a diluição da gema em tampão e utilizando crioetanol para remover o PEG presente no precipitado [67]. Posteriormente, Polson [68] estudou a utilização de clorofórmio para remover as lipoproteínas. A gema foi colocada em tampão fosfato, PEG 3,5% e clorofórmio, sendo que por centrifugação separaram a FPSA das substâncias lipofílicas dissolvidas no clorofórmio. Nestas circunstâncias originaram-se três fases: uma fase aquosa e límpida contendo a IgY; uma fase semi-sólida; e uma fase orgânica alaranjada. A IgY foi posteriormente recuperada por precipitação com PEG 12% [68]. No entanto, as técnicas utilizando solventes orgânicos devem ser evitadas por motivos ambientais e por possível risco de desnaturação das proteínas. Apesar dos efeitos nefastos, Polson [68] utilizou clorofórmio e obteve a IgY com a sua atividade preservada, além de que obteve um rendimento de cerca de 2,57 vezes superior relativamente ao método convencional com PEG [23]. Bade e Stegemann [69] utilizaram propan-2-ol e acetona a temperaturas reduzidas para solubilizar e remover as lipoproteínas, com uma etapa posterior de purificação por cromatografia de troca aniônica ou precipitação das proteínas contaminantes com PEG a 12% [69].

Jensenius *et al.* [61] introduziram o método de diluição da gema em água e congelamento/descongelamento a pH 7, com base no princípio de que os lípidos agregam a baixa força iônica. Num outro método, os autores adicionaram sulfato de dextrana ao sobrenadante (que interage com as lipoproteínas da gema, permitindo a sua remoção) juntamente com cloreto de cálcio (que induz a precipitação do excesso de sulfato de dextrana). Os sobrenadantes obtidos pelos dois métodos foram sujeitos à ação do sulfato de

sódio, permitindo recuperar a IgY. Utilizando o método que recorre ao sulfato de dextrana, recuperou-se 70-80% da IgY e com a utilização do método de diluição em água obteve-se 50-70% da IgY [61]. Bizhanov e Vyshniauskis [75] utilizaram o azul de dextrana para isolar a IgY, tendo-se comparado os resultados com as técnicas utilizando PEG e clorofórmio. A atividade da IgY mostrou-se idêntica, contudo o resultado mais satisfatório em termos de recuperação da IgY foi com a utilização de PEG (93,6%) [75]. McLaren *et al.* [53] utilizaram ácido caprílico (octanóico) e sulfato de amónio para separar as lipoproteínas da FPSA, permitindo uma recuperação de IgY de 64%. Vieira *et al.* [62] procederam à extração da IgY diluindo a gema em TBS, que favorece a formação de um precipitado que foi posteriormente separado por centrifugação. Para induzir a precipitação dos lípidos no precipitado foi adicionado cloreto de magnésio e ácido fosfotúngstico, sendo posteriormente acrescentados à solução diluída da gema. Após centrifugação, adicionou-se sulfato de amónio ao sobrenadante como agente “*salting out*”, permitindo recuperar 63% da IgY [62].

Hatta *et al.* [63] estudaram ainda o efeito de doze gomas naturais na extração da IgY recorrendo ao método de diluição da gema em água, cromatografia de troca aniónica e sulfato de sódio. Foi necessária uma etapa de precipitação com sulfato de sódio após a cromatografia, uma vez que o eluato continuava com as restantes livetinas. Os resultados mais favoráveis relativamente à remoção lipídica foram com a utilização de λ -carragenana, obtendo-se 73% da IgY com 98,3% de pureza. Supõe-se que o que causa a precipitação das lipoproteínas seja a ligação iónica entre a carga negativa das gomas e a carga positiva da lipoproteína [63]. Chang *et al.* [64] estudaram também várias gomas naturais, obtendo melhores resultados com pectina (recuperação de 73,92% e pureza de 20,87%) e piores resultados com a carragenana (recuperação de 33,25% e pureza de 19,3%), refutando os resultados de Hatta *et al.* [63]. As condições ótimas de extração revelaram ser a pH 5, embora com a utilização de alginato, carragenana e carboximetilcelulose fossem com 0,1% da goma enquanto que com a pectina foram a 0,15% [64]. Tan *et al.* [76] utilizaram uma solução de remoção lipídica contendo carragenana, pectina e cloreto de cálcio, à qual se adicionou a gema. Ao sobrenadante obtido após centrifugação, adicionou-se sulfato de amónio. Para termos comparativos, os autores realizaram ainda a extração da IgY com *kits* comerciais. Os *kits* comerciais de purificação visam uma fase inicial de remoção da fração lipídica, seguida de uma fase de purificação da IgY por precipitação. O *kit Eggcellent* (Thermo Pierce) assume um rendimento de 80-120 mg IgY/gema e pureza de 85-95%, e com a utilização do

Eggstract (Promega) prevê-se um rendimento de 2-5 mg IgY/mL gema e pureza de 75-90%. O kit *Eggcellent* tem o custo de ~240€ com uma quantidade suficiente para isolar a IgY de 5 gemas, enquanto o *Eggstract* é mais dispendioso (~450€ com quantidade suficiente para isolar a IgY de 6 gemas) [77,78]. O método de Tan *et al.* [76] demonstrou uma maior recuperação da IgY (7,3 mg/mL) relativamente aos *kits* após a adição da solução de remoção lipídica e posterior centrifugação. Contudo, após a segunda precipitação com sulfato de amónio, o método demonstrou uma menor recuperação da IgY (5,1 mg/mL) relativamente ao kit *Eggcellent* (6,1 mg/mL) [76].

Todos os estudos descritos anteriormente permitiram a extração da IgY recorrendo a agentes que interagem com as lipoproteínas, permitindo a sua remoção. Em termos de recuperação da IgY, não se obteve os melhores resultados, exceto no estudo comparativo de Bizhanov e Vyshniauskis [75] com a utilização de PEG e sulfato de amónio em que se recuperou 93,6% da IgY. A pureza, quando mencionada, não é satisfatória; exceto no estudo de Hatta *et al.* [63] em que se obteve uma pureza de 98,3%, sendo que a principal explicação para tal é a utilização da cromatografia de troca aniónica.

Existem ainda técnicas que recorrem a colunas cromatográficas para purificar a IgY. Akita e Nakai [54] procederam à diluição da gema em água para separar as lipoproteínas da FPSA e agregar os lípidos. Após centrifugação, as proteínas do sobrenadante foram sujeitas à ação “*salting out*” pelo sulfato de amónio, sendo posteriormente sujeitas a três etapas distintas: ultrafiltração ou precipitação com etanol ou precipitação com sulfato de sódio, obtendo-se uma pureza de cerca de 93% com uma recuperação de 98-99%. Foi ainda realizada cromatografia de troca aniónica ou cromatografia de filtração em gel, que aumentou a pureza para 99%, com recuperação de 95% no caso da cromatografia de troca aniónica e 98% no caso da cromatografia de filtração em gel [54]. Hassl e Aspöck [65] avaliaram a possibilidade de utilizar a cromatografia de interação hidrofóbica seguido de cromatografia de filtração em gel para purificar a IgY da gema do ovo tratada com PEG. Obteve-se 1,2 mg/mL de IgY com uma pureza superior a 85% e o produto final praticamente não apresentou proteínas residuais da gema, agregados nem fragmentos da IgY, além de ter preservado a atividade do anticorpo [65]. Hansen *et al.* [66] aplicaram as proteínas que extraíram numa coluna de cromatografia de interação tiofílica, cujo adsorvente consiste em agarose ativada por divinilsulfona acoplada ao 2-mercaptoetanol. O processo de extração iniciou-se com a diluição da gema em ácido clorídrico e procedeu-se à centrifugação,

obtendo-se o sobrenadante que foi tratado com sulfato de amônio e um precipitado que foi redissolvido em tampão fosfato e sulfato de sódio. Após a cromatografia, a recuperação de IgY foi de 85% com uma pureza 5,3 vezes superior ao extrato solúvel da gema [66].

Conclui-se que as técnicas cromatográficas são geralmente utilizadas após a utilização de outras técnicas não cromatográficas. Contudo, podem não garantir a completa purificação da IgY [63]. Os resultados de Akita e Nakai [54] mostraram-se particularmente promissores em termos de recuperação (95-99%) e pureza (93-99%). Os procedimentos que envolvem a cromatografia geralmente apresentam recuperações e fatores de pureza com valores superiores a 85%, e são portanto técnicas mais eficientes, mas também mais dispendiosas.

Como alternativa, Stalberg *et al.* [79] efetuaram a extração da IgY com SABs constituídos por Triton X-100 e fosfato de sódio, obtendo uma recuperação do anticorpo superior a 97%. Com esta abordagem, a IgY encontrou-se na fase contendo maioritariamente sal (fase inferior), contudo os lípidos não se encontraram totalmente retidos na fase de surfactante (fase superior). Os autores testaram ainda sistemas PEG-dextrana e PEG-fosfato de sódio; contudo, os lípidos e a IgY ficam retidos na mesma fase [79].

A comparação das várias técnicas de extração e purificação da IgY nem sempre é fácil, pois os vários estudos apresentam os resultados de diferente forma e nem todos fazem uma análise quantitativa [67–69,80]. Assim sendo, de modo a selecionar as melhores técnicas de extração e purificação, os estudos comparativos [64,74–76,81] são mais úteis. Deignan *et al.* [74] compararam a capacidade de remoção lipídica das técnicas recorrendo à diluição da gema em água, PEG, sulfato de dextrana, ácido fosfotúngstico e propan-2-ol/acetona. Os autores [74] verificaram que as técnicas mais eficazes na remoção da fração lipídica são com a utilização de sulfato de dextrana (recuperação de 15,6 mg/mL de IgY e pureza de 64,3%), ácido fosfotúngstico (recuperação de 15,1 mg/mL de IgY e pureza de 69,8%) e com a diluição da gema em água (recuperação de 13,1 mg/mL de IgY e pureza de 71,1%), sendo que o pior resultado consiste na utilização de propan-2-ol e acetona (recuperação de 7,11 mg/mL de IgY e pureza de 57%). Após a utilização destas cinco técnicas, a FPSA resultante foi sujeita à ação de PEG 12%, sulfato de sódio e sulfato de amônio para precipitar a IgY, contudo o PEG 12% mostrou-se claramente mais eficaz na precipitação da IgY presente na FPSA. A utilização de PEG 12% na FPSA obtida com o sulfato de dextrana permitiu a obtenção de 8,8 mg/mL de IgY e a utilização de PEG 12% na

FPsA obtida com o ácido fosfotúngstico permitiu uma recuperação de 8,62 mg/mL de IgY. Obteve-se também um resultado considerável com a utilização de PEG 12% na FPsA conseguida no método de diluição da gema em água (recuperação de 7,49 mg/mL de IgY). Akita e Nakai [81] efetuaram um estudo comparativo entre os métodos de diluição da gema em água, PEG, sulfato de dextrana e goma xantana. Os melhores resultados foram obtidos com o método de diluição da gema em água (recuperação de 9,8 mg/mL e pureza de 94%), contudo recorreu-se a técnicas cromatográficas para obter este resultado. No entanto, o sobrenadante obtido após a utilização da técnica de diluição da gema em água foi aquele em que se observou uma maior recuperação da IgY (91%), mesmo previamente à cromatografia. A técnica utilizando sulfato de dextrana permitiu recuperar 7,5 mg/mL de IgY com 87% de pureza, demonstrando no entanto ser menos satisfatória do que com a diluição da gema em água, contrariando o resultado de Deignan *et al.* [74]. Foi ainda comparada a eficiência entre o PEG e o sulfato de sódio como agentes precipitantes, sendo que o PEG demonstrou ser mais eficaz na precipitação da IgY contida no sobrenadante, corroborando o resultado de Deignan *et al.* [74]. Sempre que fornecidos na literatura, os graus de pureza e rendimento das diferentes técnicas estudadas até ao momento encontram-se sumariados na Tabela 3.

Conclui-se que a utilização de sulfato de dextrana e a diluição da gema em água são bons procedimentos para a remoção da fração lipídica [74,81]. Todavia, a diluição da gema em água é um procedimento mais económico do que a utilização de sulfato de dextrana. A precipitação das livetinas com PEG 12% demonstra ser a melhor técnica de recuperação da IgY, contudo exige várias etapas de centrifugação e a posterior redissolução do precipitado [74,80,81].

Tabela 3 - Comparação das técnicas utilizadas no âmbito da extração e purificação da IgY, em termos de rendimento/recuperação e pureza.

Técnica(s) realizada(s)	Rendimento/ Recuperação da IgY	Pureza da IgY	Referência
(a): Sulfato de dextrana + CaCl ₂ + Na ₂ SO ₄ (b): Diluição da gema em água + Congelamento/descongelamento a pH 7 + Na ₂ SO ₄	(a): 70-80% (b): 50-70%	---	Jensenius <i>et al.</i> [61]
Azul de dextrana + (NH ₄) ₂ SO ₄ + TBS	49,4%	---	Bizhanov e Vyshniauskis [75]
Clorofórmio + (NH ₄) ₂ SO ₄ + TBS	52%	---	
PEG 6000 + (NH ₄) ₂ SO ₄ + TBS	93,6%	---	
Ácido caprílico + (NH ₄) ₂ SO ₄	64%	---	McLaren <i>et al.</i> [53]
TBS + Ácido fosfotúngstico e MgCl ₂ (NH ₄) ₂ SO ₄	85% (i) 63%	---	Vieira <i>et al.</i> [62]
Diluição da gema em água + Carragenana + Cromatografia de troca iónica + Na ₂ SO ₄	73%	98,3%	Hatta <i>et al.</i> [63]
Alginato de sódio	38,96%	15,05%	Chang <i>et al.</i> [64]
Carragenana	33,25%	19,30%	
Carboximetilcelulose	60,12%	20,19%	
Pectina	73,92%	20,87%	
Pectina + Carragenana + CaCl ₂ + (NH ₄) ₂ SO ₄	7,3 mg/mL por ovo (i) 5,1 mg/mL por ovo (ii)	54% (i) 80% (ii)	Tan <i>et al.</i> [76]
<i>Eggcellent (Thermo Pierce)</i>	6,8 mg/mL por ovo (i) 6,1 mg/mL por ovo (ii)	57% (i) 76% (ii)	
<i>Eggstract (Promega)</i>	2,2 mg/mL por ovo (i) 1,8 mg/mL por ovo (ii)	64% (i) 74% (ii)	
Diluição da gema em água 6x; Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ; Ultrafiltração/ Precipitação com etanol/ Precipitação com Na ₂ SO ₄ ; Cromatografia de troca aniónica e de filtração em gel	95-99%	93-99%	Akita e Nakai [54]
PEG Cromatografia de interação hidrofóbica Cromatografia de filtração em gel	1,2 mg/mL por ovo	>85%	Hassl e Aspöck [65]
HCl + (NH ₄) ₂ SO ₄ + Na ₂ SO ₄ Cromatografia de afinidade (interação tiofílica)	85%	5,3x	Hansen <i>et al.</i> [66]
SAB (Fosfato de sódio + Triton X-100)	>97%	---	Stalberg e Larsson [79]
Diluição da gema em água + Congelamento/descongelamento a pH 7	13,1 mg/mL por ovo (i)	71,1% (i)	Deignan <i>et al.</i> [74]
Tampão fosfato + PEG 3,5% PEG 12% + Crioetanol	11 mg/mL por ovo (i)	57,1% (i)	
TBS + Sulfato de Dextrana + CaCl ₂ Na ₂ SO ₄	15,6 mg/mL por ovo (i)	64,3% (i)	
TBS + Ácido fosfotúngstico + MgCl ₂ PEG 12% + (NH ₄) ₂ SO ₄	15,1 mg/mL por ovo (i)	69,8% (i)	
Propan-2-ol Propan-2-ol e acetona	7,11 mg/mL por ovo (i)	57,0% (i)	

(i) - Primeira etapa de remoção dos lípidos

(ii) - Segunda etapa de purificação

Tabela 3 (Continuação) - Comparação das técnicas utilizadas no âmbito da extração e purificação da IgY, em termos de rendimento/recuperação e pureza.

Técnica(s) realizada(s)	Rendimento/ Recuperação da IgY	Pureza da IgY	Referência
Diluição da gema em água 9x + Na₂SO₄ + ultrafiltração/precipitação com etanol/precipitação com Na₂SO₄; Cromatografia de filtração em gel ou troca aniónica	9,8 mg/mL por ovo	94%	Akita e Nakai [81]
PEG + Crioetanol	4,9 mg/mL por ovo	89%	
Sulfato de dextrana + CaCl₂ + Na₂SO₄	7,5 mg/mL por ovo	87%	
Diluição da gema em água + goma xantana + Na₂SO₄	7,3 mg/mL por ovo	89%	

1.2.4. Sistemas aquosos bifásicos (SABs)

Os SABs são uma técnica de extração do tipo líquido-líquido ou extração em fase líquida. A extração líquido-líquido é aplicada a misturas imiscíveis cujos solutos dissolvidos tendem a distribuir-se desigualmente entre duas fases líquidas [82]. Por vezes, esta técnica recorre a solventes orgânicos voláteis, sendo que ao utilizar este tipo de solventes poderá ocorrer desnaturação/perda de atividade de proteínas (revisto em [6]). Como uma alternativa mais biocompatível, económica e eficiente às técnicas tradicionais de extração líquido-líquido, Albertsson introduziu os SABs [83]. Estes são definidos como sistemas de duas fases aquosas imiscíveis constituídos por combinações polímero-polímero, sal-sal ou polímero-sal. Tratam-se assim de sistemas ternários compostos por água e dois solutos (revisto em [10]). Uma vez que os SABs são maioritariamente constituídos por água, constituem um meio biocompatível e por este motivo estão atualmente associados à extração e purificação de proteínas, enzimas, anticorpos, biofármacos e ácidos nucleicos [4,84–86]. Também os polímeros, de carácter hidrofóbico, estão associados à estabilização da estrutura terciária das proteínas e preservação da sua atividade (revisto em [6]). Visto que as proteínas desnaturam com a utilização de solventes orgânicos, a utilização de SABs poderá constituir uma alternativa simples e viável aos processos de extração e purificação tradicionais de proteínas, uma vez que permitem preservar a atividade das biomoléculas, além de serem fáceis de aplicar em larga escala (revisto em [11,45]).

Os mecanismos de separação, extração e purificação de compostos utilizando SABs são complexos, baseando-se em interações do tipo de *van der Waals*, eletrostáticas, pontes de hidrogénio e efeitos conformacionais entre o soluto e o solvente. A partição de uma molécula alvo entre as fases pode ser controlada por vários fatores: afinidade do soluto para

uma das fases; controle da composição do sistema, ou pela junção de co-solventes, anti-solventes ou moléculas anfipáticas ao sistema (revisto em [10]). Para compreender a partição das biomoléculas, determinam-se primeiramente os respectivos diagramas de fases, que nos elucidam sobre a composição das fases superior (S) e inferior (I) e a proporção dos volumes das mesmas. O diagrama de fases (Figura 4) contém uma curva binodal a separar a região monofásica da bifásica e *tie-lines* (TLs) respectivas que definem a composição de cada soluto na fase superior e inferior. O parâmetro *tie-line length* (TLL) define ainda a diferença nas composições das fases, uma vez que ao longo da TL o volume de uma das fases aumenta e o da fase oposta diminui, mas a composição mantém-se constante. À medida que a TL decresce em comprimento (TLL nula), atinge-se o ponto crítico (PC) na curva binodal, em que as composições e o volume nas duas fases igualam (revisto em [10]). As misturas X, Y e Z coincidentes com a reta TL diferem na composição inicial e na proporção de volume de cada fase, mas todas têm a mesma composição na fase superior (S_{PPG} , S_{LI}) e na fase inferior (I_{PPG} , I_{LI}) (revisto em [45]).

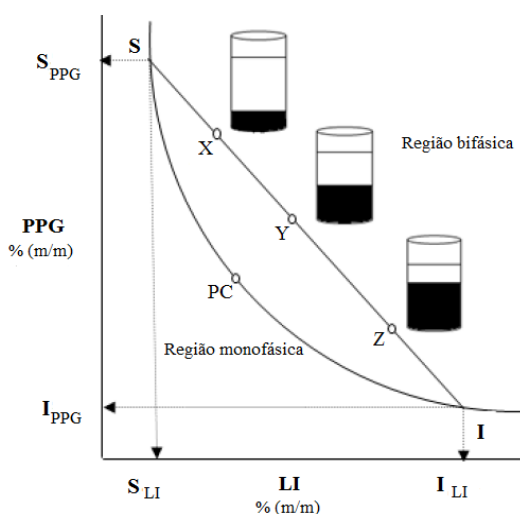


Figura 3 - Diagrama de fases de um SAB constituído por PPG e LI. Adaptado de Raja *et al.* [45]. SCI – curva binodal; PC – ponto crítico; SI - *tie-line*; S – composição da fase superior; I - composição da fase inferior; X, Y e Z - composição das misturas na região bifásica.

Em 2003, Gutowski *et al.* [87] propuseram uma nova classe de SABs constituídos por líquidos iónicos (LIs). Os LIs, por definição, são sais constituídos por dois iões assimétricos (em geral, um catião orgânico de grandes dimensões e um anião orgânico ou inorgânico de menores dimensões), que se encontram geralmente no estado líquido a temperaturas abaixo dos 100°C. São caracterizados por possuírem uma elevada condutividade iónica, estabilidade térmica e elevada capacidade de solvatação para os mais

variados solutos, assim como uma pressão de vapor desprezável por serem sais (revisto em [10]). Existe uma grande variedade de LIs, sendo portanto possível a seleção do catião e anião de acordo com a polaridade e afinidade pretendidas, cobrindo “idealmente” toda a gama de hidrofiliidade-hidrofobicidade. Visto que é possível manipular a sua estrutura química, existem alguns LIs que permitem uma elevada estabilidade de biomoléculas, como enzimas, ADN e proteínas [85,86,88]. No entanto, a solubilidade das proteínas em LIs hidrofóbicos é muito limitada, explicando a adição de água na maior parte dos estudos envolvendo este tipo de biomoléculas (revisto em [10]).

Aquando da formação de SABs, a adição de um tampão a uma solução aquosa pode não ser suficiente para controlar adequadamente o pH, uma vez que o carácter ácido ou básico do LI afeta o efeito do tampão e pode conduzir à perda de estabilidade de proteínas. Para contornar este problema, o pH pode ser ajustado utilizando LIs com efeito tampão [88]. Um tipo de LI com estas características são os [Ch][GB]-LIs, constituídos pelo catião colínio (Ch) e por aniões de derivados zwitteriônicos N-substituídos da taurina ou glicina com capacidade tampão, os *Good's Buffers* (GBs) [89]. Os GBs foram originalmente propostos por Good *et al.* [90] para serem utilizados em reações biológicas, uma vez que são moléculas altamente hidratáveis e apresentam uma gama de pK_a entre 6-8 [88–90]. Exemplos de GBs são a Tricine (N-(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil) glicina) com pK_a 8,15 a 20°C, TES (ácido 2-[[1,3-di-hidroxi-2-(hidroximetil) propan-2-il] amino] etanossulfónico) com pK_a 7,5 a 20°C, MES (ácido 2-(N-morfolino) etanossulfónico) com pK_a 6,15 a 20°C e HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanossulfónico) com pK_a 7,55 a 20°C [89,90] (Figura 4).

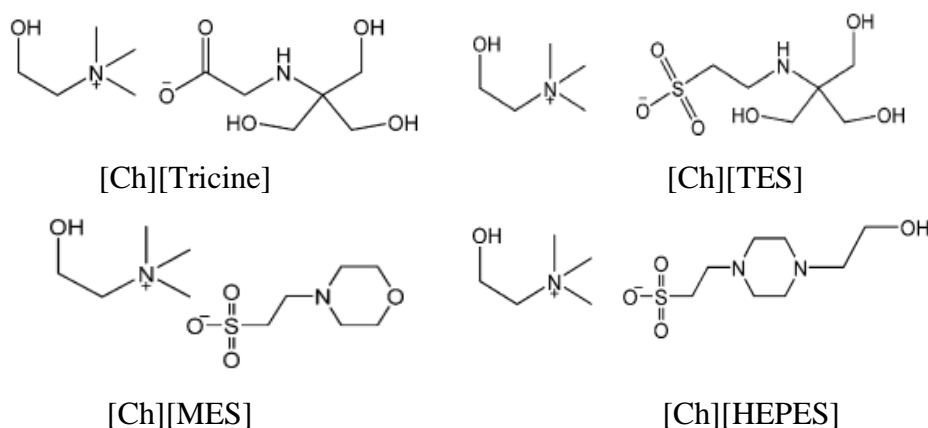


Figura 4 - Estrutura de [Ch][GB]-LIs, líquidos iônicos constituídos pelo catião colínio e aniões derivados de *Good's Buffers* (Tricine, TES, MES e HEPES). Adaptado de Taha *et al.* [89].

Os GBs apresentam um local de protonação no grupo carboxílico/sulfônico (pK_{a1}) e outro local de protonação no grupo amino (pK_{a2}), sendo este último responsável pela capacidade tampão ao pH fisiológico. Contudo, o valor de pK_{a2} é ligeiramente diminuído quando os GBs são neutralizados com o catião colínio, originando os [Ch][GB]-LIs. Esta diminuição é explicada por interações eletrostáticas entre o catião e os aniões derivados de GBs [89].

Após um estudo prévio de Taha *et al.* [88] consistindo na formação de SABs constituídos por GB-LIs para avaliar o impacto destes LIs na estabilidade da proteína BSA, os autores extraíram mais tarde a IgY com um SAB constituído por [Ch][GB]-LIs e polipropileno glicol (PPG 400) [89]. Neste sistema, a IgY encontra-se preferencialmente na fase maioritariamente constituída por LI, tendo-se demonstrado por estudos computacionais que as ligações de hidrogénio e interações *van der Waals* são responsáveis pela partição preferencial. Dependendo do GB utilizado, obteve-se uma eficiência de extração da IgY entre 79 a 94%, num único passo, embora não se tenha eliminado a β -livetina da mesma fase onde se encontra enriquecido o anticorpo alvo [89]. Devido aos resultados promissores de recuperação da IgY neste tipo de SABs, estes mesmos irão ser utilizados nesta dissertação de mestrado com o intuito de purificar a IgY num único passo. Será também avaliada a atividade e estabilidade da IgY em soluções aquosas de polímeros, sais e LIs para verificar se esta abordagem de purificação (SABs) não compromete a funcionalidade do anticorpo.

Em suma, o processo de extração e purificação da IgY deve garantir a interação com os constituintes não aquosos (permitindo a remoção da elevada quantidade de lípidos) e estratégias mais seletivas para recuperar a IgY de entre as proteínas contaminantes. Estes processos devem ter em consideração o custo e a rapidez, assegurando ainda um elevado grau de pureza e a preservação da funcionalidade do anticorpo, para que a IgY recuperada possa ser utilizada como agente terapêutico. Na inexistência de uma técnica ideal, a utilização de SABs poderá responder a esta problemática; no entanto, deverá avaliar-se a preservação da funcionalidade do anticorpo após o processo de extração/purificação.

2. Secção Experimental

2.1. Purificação da IgY através de SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs e PPG 400

2.1.1. Materiais

Os [Ch][GB]-LIs utilizados neste trabalho foram sintetizados com uma solução de hidróxido de colina (em 45% de metanol, da Sigma-Aldrich, Alemanha) e vários *Good's Buffers*, nomeadamente Tricine (pureza > 99%), TES (pureza > 99%), MES (pureza > 99%) e HEPES (pureza > 99,5%), também adquiridos na Sigma-Aldrich (EUA). As estruturas químicas dos LIs sintetizados foram posteriormente confirmadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN), pelo Bruker AMX 300 (EUA) a 300,13 MHz, utilizando o trimetilsilil propionato (TSP) como referência e D_2O (Euriso-top, França) como solvente deuterado (99,90% D).

Os SABs estudados foram formados com polipropileno glicol de peso molecular 400 g.mol^{-1} (PPG 400, Sigma-Aldrich, França) e pelos LIs sintetizados. A FPSA obtida a partir da gema e que contém a IgY foi filtrada com um filtro de seringa Whatman 0,45 μm antes de ser adicionada ao sistema como a solução aquosa. Após a separação das fases, procedeu-se à quantificação das proteínas presentes em cada fase por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Exclusão Molecular (SE-HPLC), com um detetor DAD (Hitachi Chromaster 5430 da VWR, Japão) a um comprimento de onda de 280 nm. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna analítica KW – 802,5 – 8 mm x 300 mm (Shodex, Alemanha). Como fase móvel foi utilizado tampão fosfato, preparado através da mistura de uma solução de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4 , pureza $\geq 99\%$), uma solução de hidrogenofosfato dissódico hepta hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pureza $\geq 99\%$) e cloreto de sódio (NaCl , pureza de 99,5%), sendo todos os reagentes da Panreac (Espanha). A área dos picos dos cromatogramas foi determinada através do *software* OriginPro 8. A composição das fases foi determinada através do *software* MatLab R2009b, sabendo-se de antemão o respetivo diagrama de fases e a composição da mistura inicial.

Para efetuar uma análise qualitativa das proteínas nas duas fases, realizou-se SDS-PAGE. Para este procedimento foi utilizado dodecil sulfato de sódio (SDS, pureza > 85%, Panreac, Espanha), tris(hidroximetil)aminometano ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, pureza > 99,8% Pronalab, Portugal), glicerol (pureza de 99,5%, Sigma-Aldrich, Alemanha), glicina (pureza de 99%, Acros Organics, Bélgica), azul de bromofenol (Merck, Alemanha), ácido acético (pureza > 99%, ChemLab, Bélgica), corante azul de Coomassie G-250 (Amresco, EUA), ditioneitol (99% de pureza, Acros Organics, Bélgica) e metanol (grau de HPLC, pureza >

99,9%, Fisher Scientific, EUA). Para a realização do SDS-PAGE foi utilizado o sistema Amersham™ ECL™, com tampão de corrida Amersham™ ECL™ 10x, géis 4-20% Amersham™ ECL™ de 10 poços e o marcador de peso molecular (“Rainbow Molecular Weight”) adquiridos na GE Healthcare (UK). O pH foi determinado pelo medidor de pH “827 pH lab” (Metrohm, Suíça). A água utilizada foi destilada duas vezes, passada por um sistema de osmose reversa e tratada pelo sistema de purificação de água Milli-Q plus 185 (Merck Millipore, Alemanha).

2.1.2. Procedimento experimental

2.1.2.1. Síntese e caracterização de [Ch][GB]-LIs

Os LIs foram sintetizados através de uma reação de neutralização entre o hidróxido de colina e os *Good's Buffers*, de acordo com o reportado na literatura por Taha *et al.* [89]. Para tal, adicionou-se um ligeiro excesso da solução de tampão à solução de hidróxido de colina. O procedimento foi realizado em atmosfera inerte para evitar a degradação do hidróxido de colina. A mistura permaneceu em agitação contínua durante 12 horas à temperatura ambiente e foi posteriormente evaporada a 40°C a pressões reduzidas num evaporador rotativo. Posteriormente, e contrariamente ao procedimento da literatura em que se utilizou uma mistura de acetonitrilo e metanol (1:1, v/v), utilizou-se acetato de etilo para remover o excesso de tampão. O excesso de solvente foi evaporado e o produto da reação foi seco em vácuo (10 Pa) durante 3 dias à temperatura ambiente, originando um líquido viscoso. A estrutura dos LIs foi posteriormente confirmada por ¹H RMN a 300,13 MHz. Os desvios químicos foram expressos em δ (ppm) utilizando trimetilsilil propionato (TSP) como referência e D₂O como solvente deuterado.

2.1.2.2. Purificação da IgY através de SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs, PPG 400 e FPSA

Para a obtenção da FPSA a ser adicionada aos SABs foi adaptado o procedimento experimental de Liu *et al.* [91]. Inicialmente separou-se a gema da clara e removeu-se a membrana da gema. A gema foi posteriormente diluída na proporção 1:8 (v/v) em água destilada e o pH foi ajustado a 5,0-5,2 com HCl. A mistura foi agitada durante 15 minutos a 4°C e congelada durante 8h a -20°C. Após descongelamento, centrifugou-se a 4500 rpm durante 45 minutos a 4°C, permitindo a remoção do *pellet* sólido correspondente à fração

lipídica. O sobrenadante resultante correspondente à FPSA constituiu a matriz utilizada para o processo de purificação da IgY em todos os ensaios, tendo sido filtrada antes da sua utilização.

De acordo com os diagramas de fases determinados por Taha *et al.* [89], escolheram-se pontos de mistura com uma concentração fixa de polímero, 50 % de PPG 400, e concentrações entre 7-10 % de [Ch][GB]-LIs e 40-43 % da FPSA. Desta forma, os sistemas foram formados pela adição dos três componentes nas percentagens pretendidas, perfazendo uma massa total de 3 g. O peso de todos os componentes adicionados ao sistema foi determinado com um grau de incerteza de $\pm 10^{-4}$ g. Após a agitação vigorosa, e apresentação de turbidez, os sistemas foram deixados a 25 (± 1) °C durante 3,5 h para ocorrer a completa partição das proteínas entre as fases do sistema. Em todos os SABs formados, a fase superior corresponde à fase maioritariamente constituída por PPG 400, enquanto que a fase inferior corresponde à fase maioritariamente constituída por [Ch][GB]-LI. Após o tempo de repouso, as fases foram cuidadosamente separadas, procedendo-se ao registo do volume e da massa. Após o processo de purificação, as proteínas da FPSA e ambas as fases foram analisadas quantitativamente por HPLC e o perfil proteico foi avaliado por SDS-PAGE. Para verificar a possível presença de interferências na quantificação, utilizou-se o controlo dos mesmos pontos de mistura nos ensaios de extração, sem a utilização de proteína. Foi ainda determinado o pH das fases maioritariamente constituídas por [Ch][GB]-LIs e das fases maioritariamente constituídas por PPG 400 a 25 °C, com uma incerteza de $\pm 0,03$.

2.1.2.2.1. Determinação de *Tie-lines* (TLs)

As TLs foram determinadas pelo método gravimétrico descrito por Merchuk *et al.* [92]. Cada TL foi determinada aplicando a regra da alavanca que permite relacionar a massa da fase superior e inferior e a composição total do sistema. As curvas binodais foram ajustadas de acordo com a equação 1,

$$[\text{PPG 400}] = A e^{(B[\text{LI}]^{0,5}) - (C[\text{LI}]^3)} \quad (1)$$

onde [PPG 400] e [LI] correspondem às percentagens mássicas de polímero e LI, respetivamente; e em que os parâmetros A, B e C são as constantes obtidas pela regressão.

Para a determinação das TLs, recorreu-se à resolução de um sistema com as quatro seguintes equações (2-5), para possibilitar a determinação da concentração de PPG 400 e LI em cada fase ($[PPG\ 400]_{PPG\ 400}$, $[PPG\ 400]_{LI}$, $[LI]_{PPG\ 400}$ e $[LI]_{LI}$),

$$[PPG\ 400]_{PPG\ 400} = A e^{(B[LI]_{PPG\ 400}^{0,5}) - (C[LI]_{PPG\ 400}^3)} \quad (2)$$

$$[PPG\ 400]_{LI} = A e^{(B[LI]_{LI}^{0,5}) - (C[LI]_{LI}^3)} \quad (3)$$

$$[PPG\ 400]_{PPG\ 400} = \frac{[PPG\ 400]_M}{\alpha} - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) [PPG\ 400]_{LI} \quad (4)$$

$$[LI]_{PPG\ 400} = \frac{[LI]_M}{\alpha} - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) [LI]_{LI} \quad (5)$$

em que os subscritos PPG 400 e LI designam as fases maioritariamente constituídas por polímero e LI, respetivamente; e em que M é a composição inicial da mistura. O parâmetro α corresponde ao quociente entre a massa da fase superior e a massa total da mistura.

Utilizou-se ainda a equação 6 para determinar a TLL correspondente a cada TL,

$$TLL = \sqrt{([LI]_{PPG\ 400} - [LI]_{LI})^2 + ([PPG\ 400]_{PPG\ 400} - [PPG\ 400]_{LI})^2} \quad (6)$$

2.1.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Após a separação das fases, quantificaram-se as proteínas nas duas fases por HPLC. Cada fase foi diluída numa solução de tampão fosfato ($NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7) numa proporção de 1:10 (v/v). O mesmo tampão foi utilizado como fase móvel, com uma velocidade de fluxo de $0,5\ mL \cdot min^{-1}$. As temperaturas da coluna e do *autosampler* foram mantidas a $25\ ^\circ C$ e a $10\ ^\circ C$, respetivamente. O volume de injeção foi de $25\ \mu L$ e o comprimento de onda foi fixado a $280\ nm$ utilizando um detetor DAD, sendo o tempo de retenção da IgY de $15\ min$, num tempo total de análise de $45\ min$ por amostra. A quantificação da IgY foi determinada com o auxílio de uma reta de calibração (Figura 5).

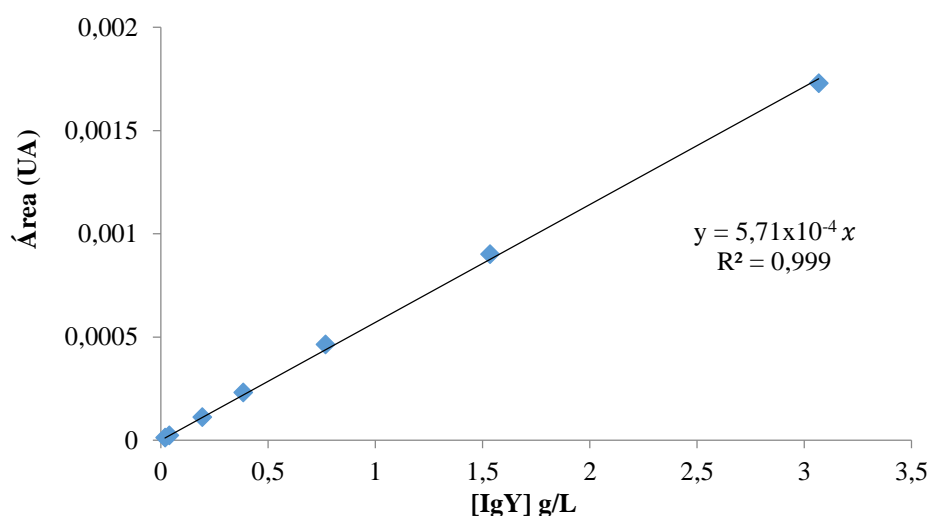


Figura 5 - Reta de calibração utilizada para determinar a concentração de IgY, com base nas áreas dos picos obtidos nos cromatogramas ($\lambda=280$ nm) em função da concentração dos padrões de IgY pura.

Para quantificar as proteínas presentes nas fases dos SABS por SE-HPLC, utilizou-se a FPSA como controlo. A partir da determinação da área do pico correspondente à IgY no cromatograma referente à FPSA e com o auxílio da curva de calibração (Figura 5) é possível determinar a concentração de IgY na FPSA. Do mesmo modo, é possível a determinação da concentração de IgY nas fases dos SABS. A massa de IgY nas fases foi determinada através da multiplicação da concentração de IgY na fase e do respetivo volume. A massa de IgY na FPSA foi determinada através da multiplicação da concentração de IgY na FPSA e da massa de FPSA adicionada (uma vez que a densidade da fração aquosa é de 0,99 g/mL, é possível efetuar uma aproximação do volume a partir da massa).

O rendimento ou recuperação de IgY ($\text{Rendimento}_{\text{IgY}}$) foi determinado através do quociente entre a massa de IgY na respetiva fase dos SABS e a massa de IgY adicionada inicialmente ao sistema, de acordo com a equação 7,

$$\text{Rendimento}_{\text{IgY}} (\%) = \frac{m_{\text{IgY}} (\text{fase inferior ou fase superior})}{m_{\text{IgY}} (\text{FPSA})} \times 100 \quad (7)$$

A pureza da IgY ($\text{Pureza}_{\text{IgY}}$) pode ser determinada através do quociente entre a área do pico correspondente à IgY no cromatograma e a soma das áreas totais dos picos de todas as proteínas presentes na mesma fase, de acordo com a equação 8,

$$\text{Pureza}_{\text{IgY}} (\%) = \frac{\text{Área pico IgY}}{\text{Área total dos picos das proteínas}} \times 100 \quad (8)$$

O coeficiente de partição da IgY (K_{IgY}) foi determinado através do quociente entre a massa de IgY na fase maioritariamente constituída por LI e a massa de IgY na fase maioritariamente constituída por PPG 400, de acordo com a equação 9,

$$K_{IgY} = \frac{m_{LI}^{IgY}}{m_{PPG\ 400}^{IgY}} \quad (9)$$

A eficiência de extração (EE_{IgY}) foi avaliada através do quociente entre a massa de IgY na fase maioritariamente constituída por LI e a massa de IgY nas duas fases, tal como descrito na equação 10,

$$EE_{IgY}(\%) = \frac{m_{LI}^{IgY}}{m_{LI}^{IgY} + m_{PPG\ 400}^{IgY}} \times 100 \quad (10)$$

2.1.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As amostras foram diluídas na proporção 1:1 (v/v) no tampão da amostra constituído por 2,5 mL de 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4 mL de 10 % (m/v) de solução de SDS, 2 mL de glicerol, 2 mg de azul de bromofenol e 310 mg de ditioneitol. As soluções foram aquecidas a 95 °C durante 5 minutos para quebrar as pontes dissulfureto e desnaturar as proteínas. A eletroforese foi realizada a 135 mV em géis de poliacrilamida (4% do *stacking* e 20% do resolvente) com um tampão de corrida constituído por 250 mM Tris-HCl, 1,92 M glicina e 1 % SDS. As proteínas foram coradas durante a noite num agitador orbital com uma solução de 0,1 % (m/v) de azul de Coomassie G-250, 50 % (v/v) de metanol e 7 % (v/v) de ácido acético. O gel foi posteriormente descorado utilizando uma solução descorante constituída por 7 % (v/v) de ácido acético e 20 % (v/v) de metanol, permitindo a remoção do excesso de corante.

2.2. Avaliação da atividade e estabilidade da IgY em soluções aquosas de polímeros, sais e LIs

2.2.1. Materiais

A IgY utilizada para esta análise foi purificada a partir da gema através do Pierce® Chicken IgY Purification Kit (Thermo Scientific, EUA). A estratégia de purificação deste kit comercial baseia-se na remoção dos lípidos numa etapa inicial e na posterior precipitação da IgY, que foi redissolvida em PBS (Sigma-Aldrich, Alemanha) e posteriormente diluída em PBS ou em água destilada obtendo-se uma concentração de 1 mg/mL para possibilitar a realização das várias técnicas. A atividade/estabilidade da IgY foi avaliada em soluções

aquosas de polímeros, constituídas por polietileno glicol de massa molecular 200 g.mol⁻¹ (PEG 200, Fluka, Alemanha), polietileno glicol de massa molecular 400 g.mol⁻¹ (PEG 400, Acros Organics, Bélgica), polietileno glicol de massa molecular 600 g.mol⁻¹ (PEG 600, Acros Organics, Bélgica) e PPG 400 (Sigma-Aldrich, França). Os sais utilizados para o mesmo efeito foram o cloreto de sódio (pureza de 99,9%, VWR Prolabo, EUA), sulfato de sódio (pureza > 99%, Sigma-Aldrich, Alemanha), carbonato de sódio (pureza ≥ 99,5%, Sigma-Aldrich, Alemanha), citrato trisódico dihidratado (JMVP S.A., Portugal) e fosfato disódico anidro (pureza > 99%, Panreac, Espanha). Os [Ch][GB]-LIs previamente sintetizados foram utilizados para esta análise, assim como o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim]Cl (pureza de 99%, Iolitec, Alemanha), triflato de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim][CF₃SO₃] (pureza de 99%, Iolitec, Alemanha), acetato de colínio, [Ch][Ac] (pureza de 98%, Iolitec, Alemanha) e o cloreto de tetrabutilamónio, [N₄₄₄₄]Cl (pureza ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Alemanha). A massa de todos os componentes nas soluções foi determinada com um grau de incerteza de ±10⁻⁴ g.

O *Western Blot* efetuou-se com um sistema de transferência “MiniProtean Tetra System” (BioRad, EUA), ocorrendo a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose com 0,45 µm de porosidade (Whatman Protan[®], Sigma-Aldrich, Alemanha). O tampão de transferência utilizado para o efeito consistiu em 25 mM Tris pH 8,3 (pureza > 99,5%, Sigma-Aldrich, Alemanha), 192 mM glicina (pureza > 98,5%, Sigma-Aldrich, Alemanha) e 20 % metanol (pureza > 99,8%, AnalaR Normapur VWR, UK). Para verificar a eficiência da transferência utilizou-se uma solução do corante *Ponceau S* 0,1 % (m/m) (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 1 % (v/v) de ácido acético (pureza > 99,5%, Panreac, Espanha). A solução de bloqueamento era constituída por 5 % (m/v) de leite magro em pó e *Tris-Buffered Saline-Tween 20* (TBS-T), sendo que este último tampão consistia em 100 mM Tris pH 8 (pureza > 99,5%, Sigma-Aldrich, Alemanha), 1,5 mM NaCl (pureza > 99,5%, Panreac, Espanha) e 0,5 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, EUA). Para detetar a IgY utilizou-se o anticorpo secundário *rabbit* policlonal anti-IgY de galinha conjugado à HRP numa concentração de 1 mg/mL (Thermo Scientific, EUA). As bandas imunorreativas foram detetadas com os reagentes de quimioluminescência ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK) de acordo com as indicações do fabricante e foram registadas em filmes de raio X (Kodak Biomax Light Film, Sigma-Aldrich, Alemanha). A técnica de ELISA foi realizada com o IgY (Galinha) ELISA Kit (Abnova Corporation, Taiwan), contendo o diluente de

ELISA, a solução de lavagem, o conjugado anti-IgY-HRP, o substrato cromogénico, a solução *stop*, o calibrador de IgY e a microplaca de ELISA contendo o anti-IgY. Foi ainda determinado o comprimento de onda a que se observava uma absorvância máxima das diferentes soluções na região ultravioleta (UV), utilizando o espectrómetro SHIMADZU UV-1800 (Pharma-Spec, UK). O Dicroísmo circular (DC) foi realizado com o espectropolarímetro JASCO J-720 (JASCO, Hiroshima, Japão) com um fotomultiplicador 175-800 nm (EXEL-308), utilizando uma cuvette Hellma de quartzo Suprasil® de 0,1 cm (Sigma-Aldrich, Alemanha). A água utilizada foi destilada duas vezes, passada por um sistema de osmose reversa e tratada pelo sistema de purificação de água Milli-Q plus 185 (Merck Millipore, Alemanha).

2.2.2. Procedimento experimental

2.2.2.1. *Western Blot*

Prepararam-se soluções aquosas de polímeros, sais e líquidos iónicos em três concentrações distintas: 10, 30 e 50 % (m/m). De acordo com a solubilidade dos sais em água, algumas concentrações não foram exequíveis. A IgY purificada e redissolvida em PBS pelo kit comercial anteriormente descrito foi diluída em água destilada na proporção 1:10 (v/v) obtendo-se uma concentração de 1 mg/mL e foi adicionada na proporção 1:1 (v/v) às soluções aquosas de polímeros, sais e LIs. A realização do *Western Blot* baseou-se no protocolo descrito em Amado *et al.* [93]. Após a realização da eletroforese, tal como descrito em 2.1.2.4., o gel, a membrana, os papéis de filtro e as esponjas foram embebidas em tampão de transferência e preparou-se a sanduíche para transferir as proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose. A transferência efetuou-se em tampão de transferência durante duas horas a 200 mA, tendo-se posteriormente verificado a eficiência da transferência das proteínas corando a membrana com *Ponceau S*. Para evitar ligações inespecíficas do anticorpo, procedeu-se à incubação da membrana durante uma hora à temperatura ambiente sob agitação na solução de bloqueamento. Posto isto, diluiu-se o anticorpo secundário anti-IgY na proporção 1:10000 numa solução de bloqueamento e procedeu-se à incubação da membrana com o anti-IgY durante uma hora, sob agitação à temperatura ambiente. A membrana foi posteriormente lavada três vezes com TBS-T durante 10, 15 e 10 minutos; e procedeu-se à revelação com os reagentes de ECL de acordo com as indicações do fabricante para detetar as proteínas transferidas num filme fotográfico.

2.2.2.2. ELISA

Prepararam-se soluções aquosas de polímeros, sais e líquidos iônicos em três concentrações distintas: 10, 30 e 50 % (m/m). De acordo com a solubilidade dos sais em água, algumas concentrações não foram exequíveis. A IgY purificada e redissolvida em PBS foi diluída com o diluente de ELISA, obtendo-se uma concentração final de 100 ng/mL e foi adicionada na proporção 1:1 (v/v) às soluções de polímeros, sais e LIs. Os padrões foram preparados segundo as indicações do fabricante. A partir do calibrador numa concentração final de 1,44 mg/mL, prepararam-se soluções padrão a 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 0 ng/mL, utilizando o diluente de ELISA nas diluições. Os padrões e as amostras foram adicionados aos poços da microplaca em duplicado, sendo que os poços já continham o anti-IgY adsorvido, permitindo a formação de complexos IgY-Anti-IgY. Após 30 minutos de incubação, os poços foram aspirados e lavados para permitir a remoção do anticorpo que não se ligou. Procedeu-se à adição da solução do conjugado anti-IgY-HRP em cada poço, que se ligou à IgY previamente reconhecida. Após nova incubação de 30 minutos e posterior lavagem dos poços para remover o anti-IgY-HRP que não se ligou, adicionou-se a solução do substrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço, permitindo que a enzima HRP catalisasse a reação. Após incubação durante 10 minutos exatos, adicionou-se a solução *stop* e procedeu-se à leitura das absorvâncias a 450 nm em duplicado, permitindo a determinação da concentração da IgY com atividade nas amostras.

2.2.2.3. Monotorização do comprimento de onda correspondente à absorvância máxima das soluções

Prepararam-se soluções aquosas de polímeros, sais e líquidos iônicos em três concentrações distintas: 10, 30 e 50 % (m/m). De acordo com a solubilidade dos sais em água, algumas concentrações não foram exequíveis. A IgY purificada e redissolvida em PBS foi diluída em água destilada na proporção 1:10 (v/v) obtendo-se uma concentração de 1 mg/mL e foi adicionada na proporção 1:1 (v/v) às soluções de polímeros, sais e LIs. A determinação do comprimento de onda a que se observava uma absorvância máxima das diferentes soluções foi realizada num intervalo de 200-400 nm e foi efetuada 24h após a adição da IgY às soluções. As absorvâncias das soluções de polímeros, sais e LIs sem IgY foram determinadas por espectrofotometria UV no intervalo 200-400 nm como controlo.

Todas as medições foram efetuadas em triplicado, tendo-se utilizado para o efeito as médias das três medições.

2.2.2.4. Dicroísmo Circular (DC)

Prepararam-se soluções aquosas de polímeros, sais e líquidos iónicos em três concentrações distintas: 10, 30 e 50 % (m/m). Tal como anteriormente, de acordo com a solubilidade dos sais em água, algumas concentrações não foram exequíveis. A IgY purificada e redissolvida em PBS foi diluída novamente em PBS (0,01 M tampão fosfato, 0,0027 M cloreto de potássio e 0,137 M cloreto de sódio, pH 7,4 a 25 °C) na proporção 1:10 (v/v) obtendo-se uma concentração de 1 mg/mL, sendo posteriormente adicionada às soluções numa proporção 1:1 (v/v) aquando da medição no DC. O espectro da amostra do controlo, na ausência de IgY, foi registado e subtraído ao respetivo espectro de DC contendo a IgY. Os espectros foram registados no intervalo de comprimento de onda 200-260 nm, com uma separação de 0,5 nm, numa cuvette cilíndrica de quartzo à temperatura ambiente. Cada espectro resulta de três acumulações originalmente registados em graus e posteriormente convertidos em elipticidade molar (θ) através do *software* do espectropolarímetro.

3. Resultados e Discussão

3.1. Purificação da IgY através de SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs + PPG 400

3.1.1. Síntese e caracterização de [Ch][GB]-LIs

A estrutura dos LIs foi avaliada por ^1H RMN, cujos desvios químicos se apresentam em seguida. As estruturas químicas com a numeração dos carbonos e respectivos prótons e as representações das vias de síntese dos [Ch][GB]-LIs encontram-se representadas na Figura 6.

[Ch][Tricine]: ^1H RMN (300 MHz, TSP/D₂O, ppm); δ [*Ch*], 3,21 (9H, *s*, C1-C3's H), 3,52 (2H, *m*, C4's H), 4,07 (2H, *m*, C5's H); δ [*Tricine*], 3,57 (6H, *s*, C1-C3's H), 3,34 (2H, *s*, C5's H)

[Ch][HEPES]: ^1H RMN (300 MHz, TSP/D₂O, ppm); δ [*Ch*], 3,21 (9H, *s*, C1-C3's H), 3,52 (2H, *m*, C4's H), 4,07 (2H, *m*, C5's H); δ [*HEPES*], 2,61 (8H, *t*, C3-C6's H), 2,84 (2H, *m*, C1C8's H), 3,14 (2H, *t*, C7's H), 3,77 (4H, *t*, C2's H)

[Ch][TES]: ^1H RMN (300 MHz, TSP/D₂O, ppm); δ [*Ch*], 3,21 (9H, *s*, C1-C3's H), 3,52 (2H, *m*, C4's H), 4,07 (2H, *m*, C5's H); δ [*TES*], 3,61 (6H, *s*, C1-C3's H), 3,09 (4H, *t*, C5C6's H)

[Ch][MES]: ^1H RMN (300 MHz, TSP/D₂O, ppm); δ [*Ch*], 3,21 (9H, *s*, C1-C3's H), 3,52 (2H, *m*, C4's H), 4,07 (2H, *m*, C5's H); δ [*MES*], 2,67 (4H, *t*, C4C6's H), 2,84 (2H, *t*, C2's H), 3,13 (2H, *t*, C1's H), 3,76 (4H, *t*, C3C5's H)

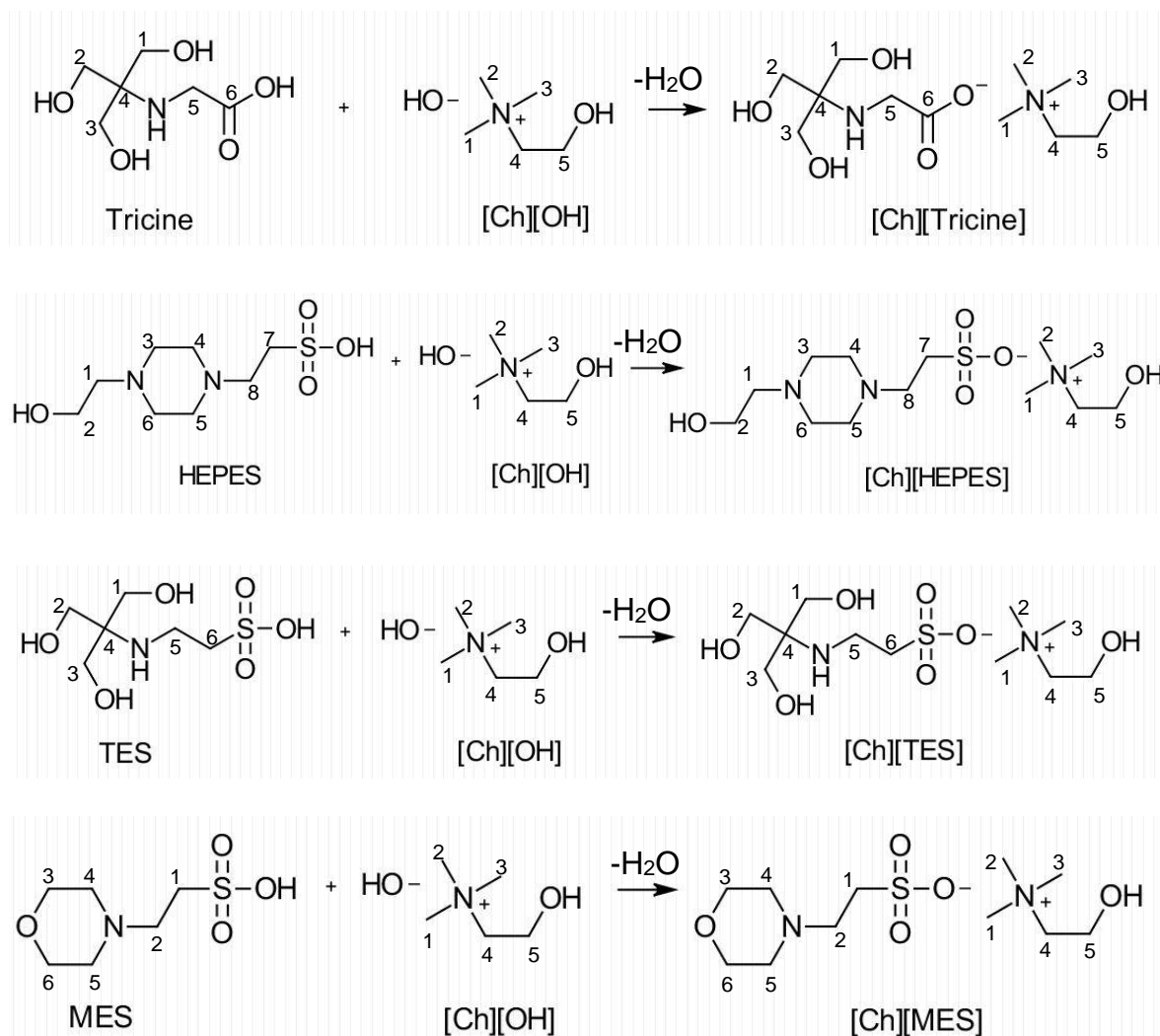


Figura 6 - Esquematização das vias de síntese dos [Ch][GB]-LIs utilizados no âmbito da purificação da IgY, e numeração dos átomos de carbono.

Os desvios químicos obtidos por ^1H RMN foram comparados com os resultados reportados na literatura nas mesmas condições [89]. Foi possível a identificação dos LIs sintetizados, embora se tenha verificado que os desvios químicos dos LIs sintetizados se encontram ligeiramente em campos mais “baixos” relativamente aos valores da literatura, devido a uma menor proteção dos núcleos. Revelou-se ainda que o espectro do [Ch][TES] apresentou um sinal relativo aos quatro prótons dos carbonos-5 e 6, enquanto que na literatura surgiu um sinal respetivo aos prótons do carbono-5 e um sinal respetivo aos prótons do carbono-6, separadamente. Contudo, conclui-se que os LIs sintetizados apresentam um elevado grau de pureza e que correspondem estruturalmente aos LIs que se pretendem utilizar.

3.1.2. SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs + PPG 400 + FPSA

Iniciou-se o estudo da purificação da IgY através de SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs + PPG 400. De acordo com os diagramas de fase reportados por Taha *et al.* [89], utilizaram-se pontos de mistura em que a concentração de PPG 400 fosse fixa a 50 % e a concentração de [Ch][GB]-LIs e FPSA variasse entre 7-10 % e 40-43 %, repetivamente; de modo a obter comprimentos das TLs (TLLs) entre 38-41% (obtidos na literatura para os mesmos pontos de mistura).

Os dados das TLs determinadas experimentalmente e das respectivas TLL encontram-se apresentadas na Tabela 4. A título de exemplo, apresenta-se na Figura 7 um diagrama de fases de um SAB constituído por [Ch][Tricine] + PPG 400 + H₂O com as TLs determinadas experimentalmente.

Tabela 4 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos SABs constituídos por 7-10 % [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG 400 + 40-43 % FPSA a 25 °C. As composições iniciais das misturas são representadas por [PPG]_M e [LI]_M, enquanto que [PPG]_{PPG} e [PPG]_{LI} representam a fração mássica de PPG 400 nas fases maioritariamente constituída por PPG 400 e LI, respetivamente; e [LI]_{LI} e [LI]_{PPG} representam a fração mássica de LI nas fases maioritariamente constituída por LI e PPG, respetivamente.

SAB	Frações mássicas (%)						TLL (%)
	[PPG] _{PPG}	[PPG] _{LI}	[PPG] _M	[LI] _M	[LI] _{LI}	[LI] _{PPG}	
[Ch][TES] + PPG 400 + FPSA	29,34 ± 0,16	67,02 ± 0,39	49,87 ± 0,00	8,58 ± 0,01	4,15 ± 0,05	13,88 ± 0,08	39,05 ± 0,09
[Ch][MES] + PPG 400 + FPSA	67,94 ± 2,13	29,01 ± 1,47	49,49 ± 0,02	10,27 ± 0,00	16,43 ± 0,77	4,79 ± 0,33	40,64 ± 0,50
[Ch][Tricine] + PPG 400 + FPSA	72,72 ± 0,39	27,42 ± 1,53	49,80 ± 0,18	7,32 ± 0,24	11,75 ± 0,66	2,78 ± 0,03	46,19 ± 2,02
[Ch][HEPES] + PPG 400 + FPSA	20,92 ± 0,68	59,35 ± 0,92	49,75 ± 0,29	8,04 ± 0,03	4,97 ± 0,14	17,27 ± 0,46	40,35 ± 0,13

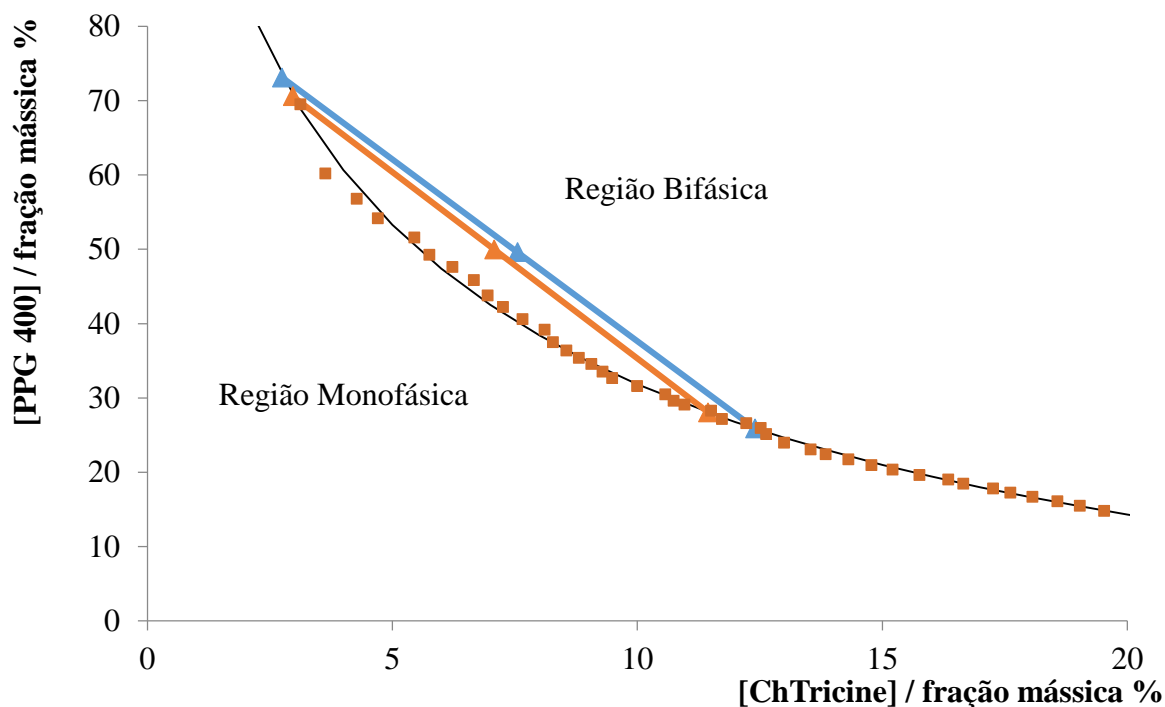


Figura 7 - Diagrama de fases do SAB constituído por [Ch][Tricine] + PPG 400 + H₂O: ajuste dos dados experimentais da curva binodal através da equação 1 (—), dados experimentais da curva binodal (■) [89] e dados experimentais das TLs (▲).

Após a separação das fases coexistentes, as mesmas foram analisadas por SE-HPLC para inferir sobre a concentração das proteínas em cada fase, permitindo a determinação do coeficiente de partição (K_{IgY}), da eficiência de extração (EE_{IgY} (%)), da pureza ($Pureza_{IgY}$ (%)) e do rendimento ($Rendimento_{IgY}$ (%)) da IgY. Por SE-HPLC, as proteínas de maior peso molecular surgem com um tempo de retenção menor do que as proteínas de menor peso molecular. O cromatograma da FPSA apresenta 5 picos, tal como se apresenta na Figura 8. O primeiro pico que surge corresponde à IgY, uma vez que se trata da proteína com maior peso molecular (180 kDa), com um tempo de retenção de 15 minutos. As proteínas α -livetina e β -livetina surgem após a IgY, sendo que a α -livetina apresenta um peso molecular de 70 kDa e a β -livetina apresenta um peso molecular de 45 kDa. Assim sendo, é possível identificar o segundo pico como correspondente à α -livetina (com um tempo de retenção de 17 minutos) e o terceiro pico como correspondente à β -livetina (com um tempo de retenção de 18 minutos). Sabe-se ainda que a proporção entre a IgY, α -livetina e β -livetina na gema do ovo é de 3:2:5 [94], o que corrobora a intensidade dos picos observada no cromatograma da FPSA (Figura 8). Relativamente ao quarto e ao quinto pico não existe informação para a

identificação das proteínas, deste modo a análise basear-se-á nas três proteínas mais significativas da FPSA (família das livetinas). A título de exemplo do perfil cromatográfico das fases dos SABs, apresentam-se também na Figura 8 os cromatogramas relativos às fases superior e inferior dos SABs constituídos por 8,5 % de [Ch][TES], 50 % de PPG 400 e 41,5 % de FPSA. A análise da amostra sem proteínas permitiu confirmar que o pico do cromatograma aos 25 minutos de retenção que não surge no cromatograma da FPSA corresponde a polímero e LI, uma vez que na ausência de proteínas os picos surgem de modo idêntico.

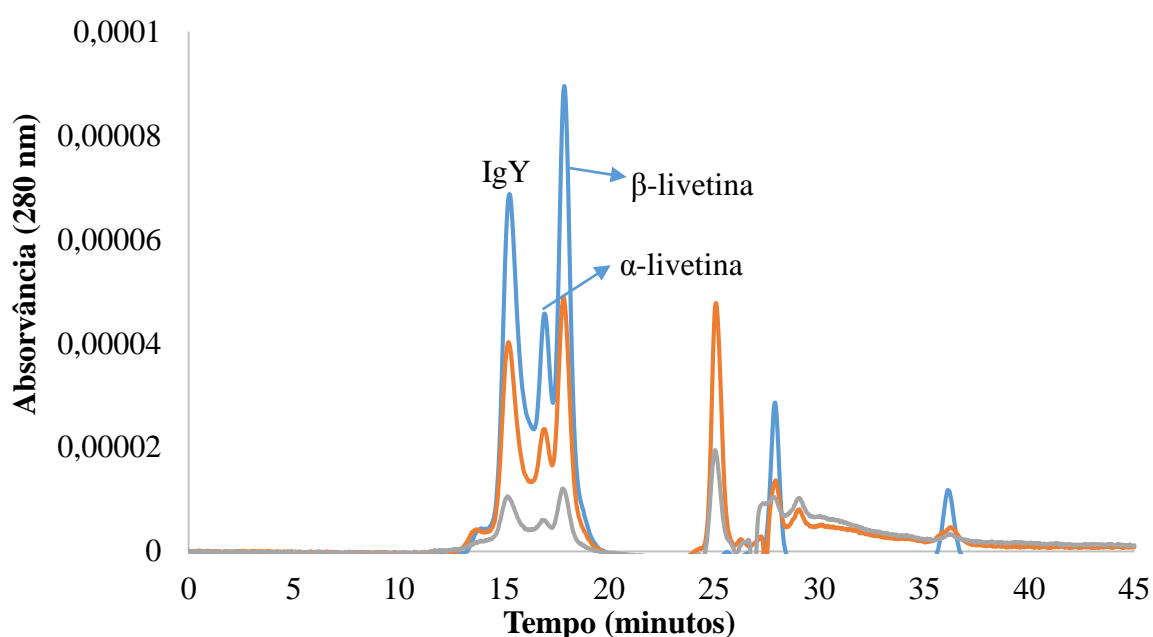


Figura 8 - Cromatogramas resultantes da análise por SE-HPLC (absorvância a 280 nm em função do tempo em minutos) da FPSA e das fases dos SABs constituídos por 8,5 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 41,5 % FPSA: fase superior (—), fase inferior (—) e FPSA inicial (—), com a identificação das três principais proteínas presentes na FPSA: IgY aos 15 minutos, α -livetina aos 17 minutos e β -livetina aos 18 minutos.

Pela análise da Figura 8 e como os cromatogramas dos SABs constituídos pelos outros [Ch][GB]-LIs apresentam um perfil cromatográfico semelhante, constata-se que as fases inferiores dos SABs (constituídas maioritariamente por LI) apresentam uma maior quantidade de IgY relativamente às fases superiores. Desta forma, focar-nos-emos na fase inferior dos sistemas para avaliar o processo de purificação da IgY, uma vez que os fatores de pureza nas duas fases eram equiparáveis. Os K_{IgY} , as EE_{IgY} (%), as $Pureza_{IgY}$ (%) e os

Rendimento_{IgY} (%) da IgY obtidos através dos SABs constituídos por 7-10% [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG 400 + 40-43 % FPSA encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Coeficiente de partição (K_{IgY}), eficiência de extração ($EE_{IgY}(\%)$), pureza (Pureza_{IgY} (%)) e rendimento (Rendimento_{IgY} (%)) da IgY nas fases inferiores dos SABs constituídos por 7-10 % [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG 400 + 40-43 % FPSA a 25 °C.

SAB	Pureza _{IgY} (%) na fase inferior	Rendimento _{IgY} (%) na fase inferior	K_{IgY}	$EE_{IgY} (%)$
8,5 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 41,5 % FPSA	26,00 ± 0,61	77,78 ± 11,89	12,05 ± 4,86	91,11 ± 3,32
10 % [Ch][MES] + 50 % PPG 400 + 40 % FPSA	26,76 ± 1,50	73,99 ± 4,38	2,78 ± 1,64	67,43 ± 14,16
7 % [Ch][Tricine] + 50 % PPG 400 + 43 % FPSA	27,16 ± 0,66	80,40 ± 11,07	9,23 ± 0,21	90,23 ± 0,20
8 % [Ch][HEPES] + 50 % PPG 400 + 42 % FPSA	35,60 ± 2,64	73,29 ± 8,72	7,91 ± 0,21	88,77 ± 0,27

O facto de ocorrer uma migração preferencial da IgY para a fase inferior dos SABs (maioritariamente constituída por LI) reflete-se nos valores satisfatórios de EE_{IgY} (67 - 91%). Os [Ch][GB]-LIs possuem vários grupos hidroxilo que favorecem a formação de pontes de hidrogénio com as moléculas de água, conferindo-lhes um elevado carácter hidrofílico. Também a IgY presente na FPSA apresenta uma natureza hidrofílica. O PPG 400 apresenta um carácter mais hidrofóbico relativamente aos LIs, daí que a IgY apresente uma maior afinidade com os LIs. Verifica-se que os rendimentos da IgY na fase inferior se encontram entre 74-80 %. Uma vez que o rendimento da IgY nas fases inferiores dos sistemas é satisfatório, seria desejável obter-se um elevado grau de pureza nessas fases. Contudo, os fatores de pureza obtidos não são os necessários para utilizar a IgY como biofármaco, uma vez que não ultrapassam os 36 %.

Segundo Taha *et al.* [89], para os mesmos pontos de mistura estudados, obtêm-se melhores resultados com a utilização de [Ch][Tricine] ($EE_{IgY} = 94\%$ e $K_{IgY} = 18$), seguido do [Ch][HEPES] ($EE_{IgY} = 93\%$ e $K_{IgY} = 14$), [Ch][TES] ($EE_{IgY} = 83\%$ e $K_{IgY} = 5$) e [Ch][MES] ($EE_{IgY} = 79\%$ e $K_{IgY} = 4$). As eficiências de extração ($EE_{IgY}(\%)$) obtidas na literatura são de 79 – 94 % [89], enquanto que as $EE_{IgY}(\%)$ obtidas neste trabalho variaram entre os 67 – 91 %. Relativamente aos coeficientes de partição (K_{IgY}) que neste trabalho variaram entre os 2 – 12, na literatura [89] variam entre os 4 – 18. De salientar que na literatura [89], a quantificação foi realizada para as proteínas totais no sistema, e neste trabalho estes valores correspondem apenas à IgY.

O objetivo da utilização de SABs no âmbito da purificação da IgY seria a recuperação seletiva do anticorpo numa das fases e a recuperação das proteínas contaminantes na fase oposta. É notório que grande parte das proteínas contaminantes neste processo se tratam da α - e β -livetina. Estas proteínas pertencem à mesma família da IgY e apresentam propriedades físico-químicas semelhantes, nomeadamente a hidrofiliicidade, o que dificulta a partição seletiva das proteínas entre as fases. Tendo em conta que não ocorre uma partição ideal para estes pontos de mistura, os resultados mais satisfatórios ocorrem com a utilização de 8,5 % de [Ch][TES] e 7 % de [Ch][Tricine], uma vez que se obtêm valores de K_{IgY} , $EE_{IgY}(\%)$ e de rendimento na fase de LI mais elevados. Nas extrações seguintes o LI utilizado para otimizar os resultados foi o [Ch][TES]. Dos quatro LIs estudados, a utilização de [Ch][MES] está associada aos piores resultados, o que corrobora os resultados do estudo de Taha *et al.* [89] e o que pode ser explicado pelo facto de ser o LI menos hidrofílico [88]. Relativamente ao grau de pureza, a utilização de [Ch][HEPES] permite a obtenção da IgY na fase inferior com um menor teor de proteínas contaminantes. Contudo, os sistemas constituídos por [Ch][HEPES] necessitam de um maior período de tempo para que ocorra a completa separação das fases, além de que o grau de pureza obtido não é ainda o necessário para que a IgY possa ser utilizado como um biofármaco.

Segundo a análise por HPLC, a concentração média de IgY na FPSA é de $9,1 \times 10^{-2}$ mg/mL. A média da concentração de IgY recuperada na fase inferior é da mesma ordem de grandeza da concentração de IgY adicionada, explicando os valores satisfatórios de rendimento_{IgY} obtidos (73 – 80 %). Os métodos cromatográficos de purificação da IgY obtêm rendimentos na ordem dos 1,2 mg/mL por ovo [65] e 9,8 mg/mL por ovo [81], enquanto que na metodologia desenvolvida neste trabalho a partir de 1,2 g de FPSA

adicionada ao sistema permite atingir uma concentração de IgY de 0,06 mg/mL, o que corresponde a 4 mg/mL por ovo.

3.1.2.2. SDS-PAGE

Após a purificação da IgY através de SABs constituídos por 7-10 % de [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG 400 + 40-43 % FPSA, avaliou-se o perfil proteico das fases resultantes. A IgY em condições redutoras desnatura, pela quebra de pontes dissulfureto, ocorrendo consequentemente a separação da cadeia pesada (com cerca de 65 kDa) da cadeia leve (com cerca de 25 kDa). Em condições semi-nativas a IgY apresenta o peso molecular de 180 kDa, tal como se verifica nos resultados do SDS-PAGE realizado após a purificação da IgY através dos SABs (Figura 9).

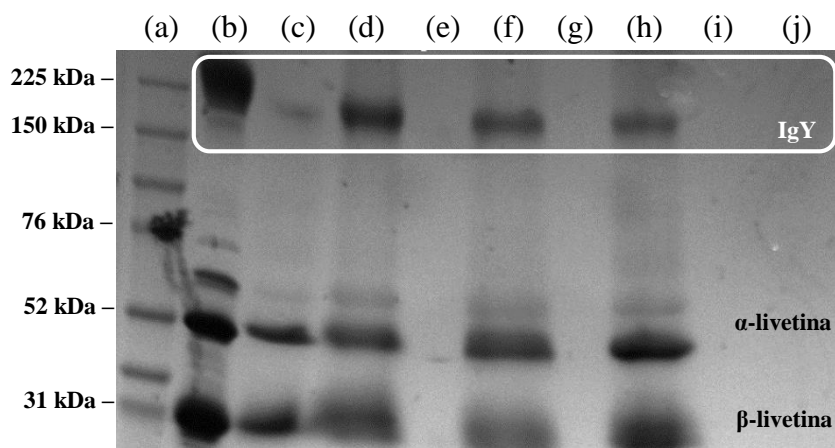


Figura 9 - SDS-PAGE em condições semi-nativas corado com azul de Coomassie, realizado após a purificação da IgY com SABs constituídos por 7-10 % [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG 400 + 40-43 % FPSA.

Poço (a) – Marcador de peso molecular

Poço (b) – FPSA

Poço (c) – Fase inferior do SAB constituído por 8 % [Ch][HEPES] + 50% PPG 400 + 42 % FPSA

Poços (d) e (e) – Fase inferior e superior do SAB constituído por 8,5 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 41,5 % FPSA, respetivamente

Poços (f) e (g) – Fase inferior e superior do SAB constituído por 10 % [Ch][MES] + 50 % PPG + 40 % FPSA, respetivamente

Poços (h) e (i) – Fase inferior e superior do SAB constituído por 7 % [Ch][Tricine] + 50 % PPG 400 + 43 % FPSA, respetivamente

Poço (j) – Fase superior do SAB constituído por 8 % [Ch][HEPES] + 50% PPG 400 + 42 % FPSA

Pela análise do perfil proteico obtido (Figura 9), confirma-se que a FPSA (poço (b)) contém IgY, α -livetina (albumina sérica das aves) por volta dos 70 kDa e β -livetina (α_2 -glicoproteína) que se verifica aos 45 kDa, entre outras proteínas menos abundantes. Os resultados do SDS-PAGE evidenciam ainda que todas as fases inferiores dos SABs (poços (c, d, f, h)), maioritariamente constituídas por LI, contém IgY e α - e β -livetina, ocorrendo ainda uma diminuição no teor de algumas proteínas contaminantes com um peso molecular compreendido entre os 60-75 kDa. O facto de a IgY migrar preferencialmente para a fase inferior dos SABs, juntamente com a α - e β -livetina justifica os baixos fatores de pureza obtidos. Verifica-se ainda que as fases superiores dos SABs predominantemente constituídas por PPG 400 (poços (e,g,i,j)) encontram-se isentas de proteínas ou as proteínas existem numa concentração reduzida, confirmando a elevada afinidade das proteínas com a fase de LI. Relativamente ao teor de IgY, neste SDS-PAGE evidenciou-se uma perda do anticorpo na fase inferior do SAB constituído por [Ch][HEPES] (fase maioritariamente constituída por LI, poço (c)) em relação aos outros SABs. Esta observação poderá ser explicada pelos valores de pH verificados nos SABs constituídos por [Ch][HEPES], PPG 400 e FPSA. O pH é um fator importante nos processos de extração e purificação e pode também influenciar a estabilidade da IgY. É de particular importância a determinação do pH da fase inferior dos sistemas, constituída maioritariamente pelos [Ch][GB]-LIs, uma vez que os GBs asseguram o controlo do pH. Os valores de pH determinados nas fases superior e inferior dos SABs estudados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de pH das fases dos SABs constituídos por 7-10 % [Ch][GB]-LIs + 50 % PPG 400 + 40-43 % FPSA.

[Ch][GB]-LI	pK _a do GB a 20 °C [90]	pK _{a2} do GB a 25 °C [89]	pK _{a2} do [Ch][GB] a 25 °C [89]	pH na fase rica em LI (Fase inferior)	pH na fase rica em PPG 400 (Fase superior)
[Ch][MES]	6,15	6,12	6,01	8,19	8,11
[Ch][TES]	7,50	7,30	7,26	8,02	8,05
[Ch][Tricine]	8,15	8,08	7,17	8,77	8,75
[Ch][HEPES]	7,55	7,35	7,87	7,07	7,15

As extrações foram realizadas em meio alcalino, nomeadamente a pH 7,1 - 8,8. Uma vez que os valores de pH são superiores ao pI da IgY (5,7 - 7,6), o anticorpo encontra-se

carregado negativamente. No entanto, verifica-se que os valores de pH nas fases dos SABs constituídos por [Ch][HEPES] se encontram na região do pI da IgY, consequentemente poderá ocorrer precipitação do anticorpo nestes sistemas. Contudo, macroscopicamente não se verificou precipitação de proteínas nos SABs constituídos por [Ch][HEPES]. É ainda de referir que as proteínas com carga negativa à sua superfície tendem a apresentar uma maior afinidade com as fases de LIs devido à interação entre os resíduos da proteína carregados negativamente e o catião colínio dos LIs [95].

3.1.3. Purificação da IgY variando a concentração de [Ch][TES]

Uma vez que se obtiveram resultados satisfatórios com a utilização de [Ch][TES], procedeu-se à definição de novos pontos de mistura ao longo da região bifásica para otimizar os resultados com a utilização de SABs constituídos por este LI e avaliar se a variação da fração mássica do LI poderá influenciar os resultados (Figura 10).

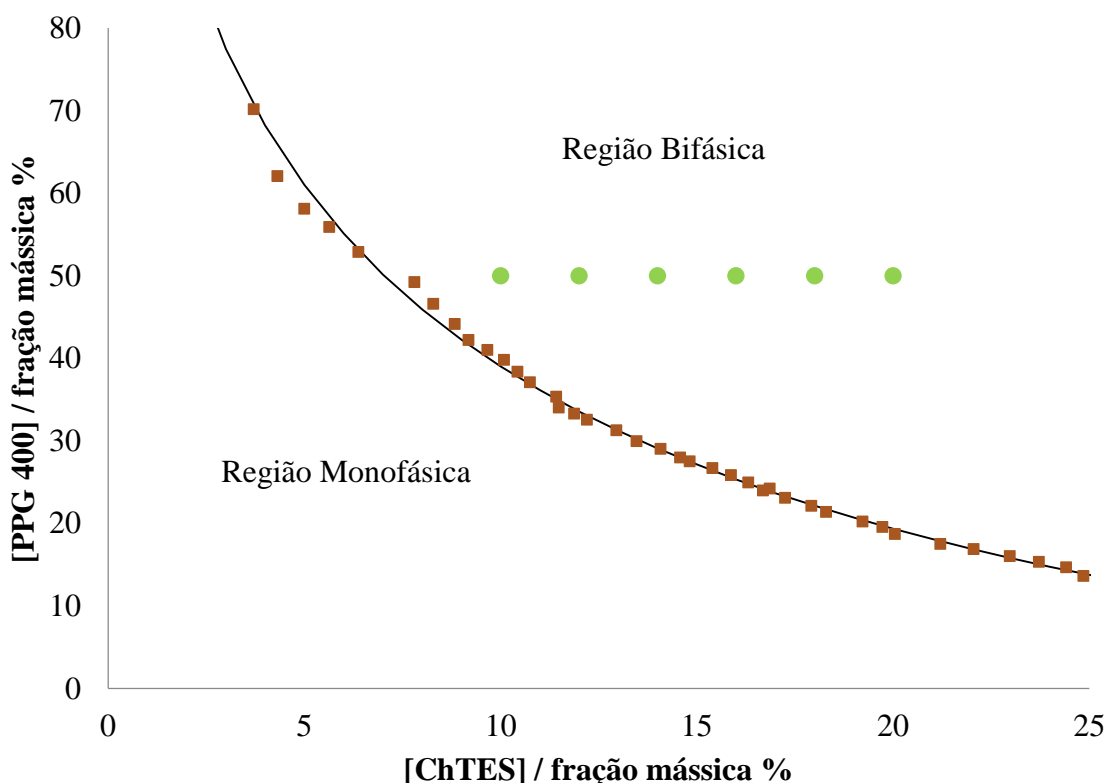


Figura 10 - Diagrama de fases identificando os pontos de mistura a estudar (●), nomeadamente a 10-20 % [Ch][TES], 50 % PPG 400 e 30-40 % FPSA.

Os dados experimentais das TLs determinadas experimentalmente e as respectivas TLLs encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos SABs constituídos por [Ch][TES] + PPG 400 a 25 °C. As composições iniciais das misturas são representadas por [PPG]_M e [LI]_M, enquanto que [PPG]_{PPG} e [PPG]_{LI} representam a fração mássica de PPG 400 na fase maioritariamente constituída por PPG 400 e LI, respetivamente; e [LI]_{LI} e [LI]_{PPG} representam a fração mássica de LI na fase maioritariamente constituída por LI e PPG, respetivamente.

SAB	Frações mássicas (%)						TLL (%)
	[PPG] _{PPG}	[PPG] _{LI}	[PPG] _M	[LI] _M	[LI] _{LI}	[LI] _{PPG}	
[Ch][TES] 10 % + PPG 400 50 % + FPSA 40 %	20,63 ± 2,32	72,13 ± 3,36	49,67 ± 0,02	10,27 ± 0,07	3,56 ± 0,37	19,14 ± 1,68	53,83 ± 0,61
[Ch][TES] 12 % + PPG 400 50 % + FPSA 38 %	82,04 ± 2,16	17,89 ± 0,78	49,72 ± 0,09	11,95 ± 0,02	21,18 ± 0,64	2,60 ± 0,18	66,80 ± 1,21
[Ch][TES] 14 % + PPG 400 50 % + FPSA 36 %	82,65 ± 0,27	12,14 ± 1,09	49,60 ± 0,44	13,91 ± 0,23	26,82 ± 1,26	2,55 ± 0,02	74,57 ± 1,17
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 50 % + FPSA 34 %	89,76 ± 3,76	9,48 ± 1,08	49,94 ± 0,03	15,95 ± 0,03	30,22 ± 1,51	2,03 ± 0,25	85,12 ± 2,12
[Ch][TES] 18 % + PPG 400 50 % + FPSA 32 %	90,56 ± 0,12	6,51 ± 0,21	49,76 ± 0,22	17,94 ± 0,04	34,88 ± 0,40	1,96 ± 0,01	90,26 ± 0,23
[Ch][TES] 20 % + PPG 400 50 % + FPSA 30 %	90,57 ± 1,78	3,96 ± 0,17	49,65 ± 0,08	20,13 ± 0,22	40,42 ± 0,45	1,97 ± 0,12	94,77 ± 1,34

Após a análise das fases dos SABs por HPLC, determinou-se o grau de pureza, rendimento, K_{IgY} e EE_{IgY} (%) das mesmas (Tabela 8).

Tabela 8 - Coeficiente de partição (K_{IgY}), eficiência de extração (EE_{IgY} (%)), pureza ($Pureza_{IgY}$ (%)) e rendimento ($Rendimento_{IgY}$ (%)) da IgY nas fases inferiores dos SABs constituídos por 10-20 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 30-40 % FPSA a 25 °C.

SAB	Pureza _{IgY} (%) na fase inferior	Rendimento _{IgY} (%) na fase inferior	K_{IgY}	EE_{IgY} (%)
[Ch][TES] 10 % + PPG 400 50 % + FPSA 40 %	34,99 ± 1,18	93,59 ± 4,94	6,72 ± 3,68	85,41 ± 6,90
[Ch][TES] 12 % + PPG 400 50 % + FPSA 38 %	24,48 ± 0,46	74,79 ± 13,22	14,78 ± 8,82	90,78 ± 5,15
[Ch][TES] 14 % + PPG 400 50 % + FPSA 36 %	24,14 ± 0,24	66,73 ± 0,56	3,18 ± 0,21	76,07 ± 1,20
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 50 % + FPSA 34 %	32,39 ± 1,20	89,05 ± 2,35	4,15 ± 1,87	79,21 ± 7,56
[Ch][TES] 18 % + PPG 400 50 % + FPSA 32 %	32,34 ± 0,99	95,36 ± 4,43	4,70 ± 1,05	82,15 ± 3,30
[Ch][TES] 20 % + PPG 400 50 % + FPSA 30 %	28,38 ± 3,02	92,54 ± 3,39	5,78 ± 2,77	83,91 ± 6,58

Evidencia-se novamente a elevada afinidade da IgY com as fases de LI, uma vez que as EE_{IgY} variaram entre os 76 – 91 % e os K_{IgY} variaram entre 3 – 15. Os rendimentos da IgY obtidos nas fases inferiores variaram entre 67 – 95 %, sendo superiores nos SABs constituídos por 10, 16, 18 e 20 % de [Ch][TES]. O grau de pureza continua insuficiente, uma vez que não ultrapassa os 35 %. Foi ainda realizado SDS-PAGE das fases resultantes dos SABs constituídos por 10-20 % [Ch][TES], 50 % PPG 400 e 30-40 % FPSA, cujos resultados se encontram na Figura 11.

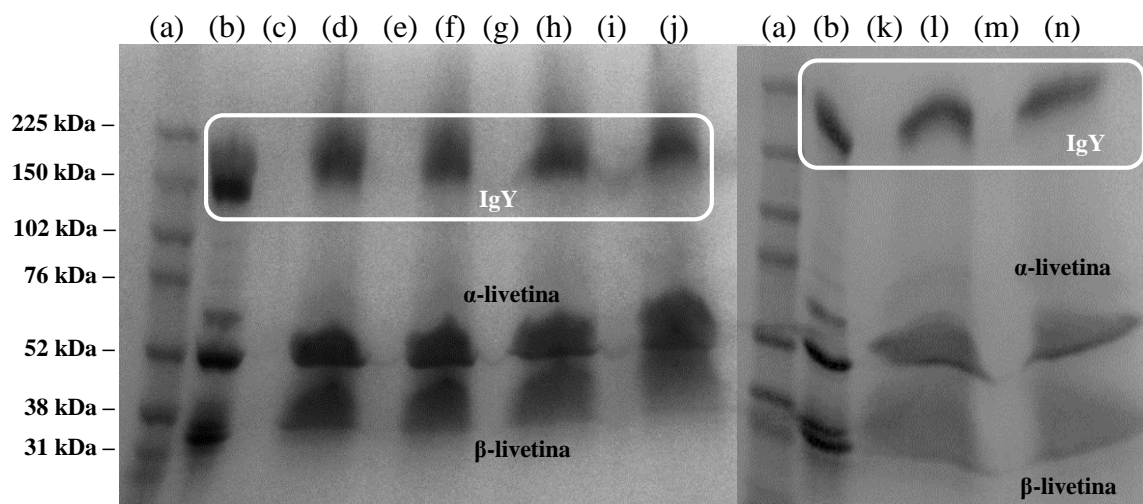


Figura 11 - SDS-PAGE em condições semi-nativas corado com azul de Coomassie, realizado após a purificação da IgY com SABs constituídos por 10-20 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 30-40 % FPSA.

Poço (a) – Marcador de peso molecular

Poço (b) – FPSA

Poços (c) e (d) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 10 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 40% FPSA, respetivamente

Poços (e) e (f) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 12 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 38 % FPSA, respetivamente

Poços (g) e (h) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 14 % [Ch][TES] + 50 % PPG + 36 % FPSA, respetivamente

Poços (i) e (j) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 16 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 34 % FPSA, respetivamente

Poços (k) e (l) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 18 % [Ch][TES] + 50 % PPG + 32 % FPSA, respetivamente

Poços (m) e (n) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 20 % [Ch][TES] + 50 % PPG 400 + 30 % FPSA, respetivamente

Mais uma vez se confirma a elevada afinidade das proteínas para a fase de LI, uma vez que a quantidade de proteína obtida nas fases superiores dos SABs (constituídas maioritariamente por PPG 400) não foi detetável quando corada com azul de Coomassie. Conclui-se assim que a variação da fração mássica de [Ch][TES] não permite aumentar o grau de pureza, uma vez que a IgY e as proteínas contaminantes continuam a encontrar-se na mesma fase.

3.1.4. Purificação da IgY variando a concentração de [Ch][TES] e PPG 400

Definiram-se novos pontos de mistura na região bifásica de modo a otimizar o processo e verificar se a variação da fração mássica de PPG 400 quando a fracção mássica de [Ch][TES] se encontra definida a 10 e 16 % poderia contribuir para melhorar os resultados (Figura 12).

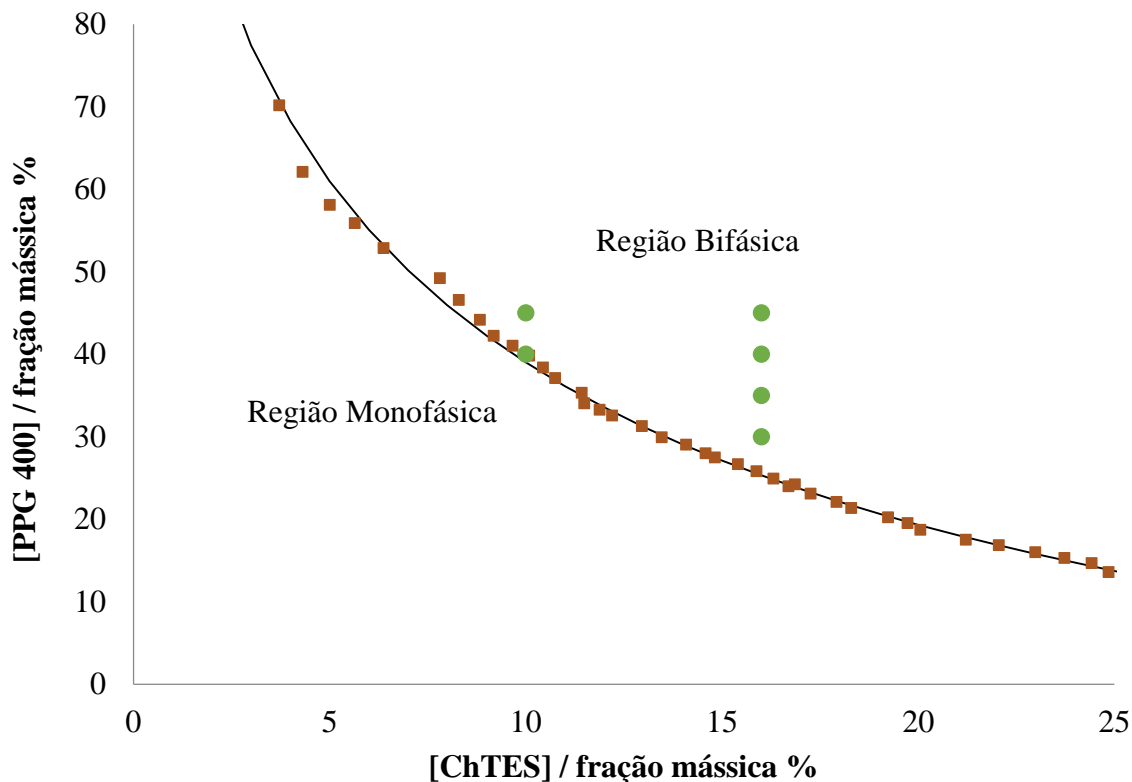


Figura 12 - Diagrama de fases identificando os pontos de mistura a estudar (●), nomeadamente a 10 e 16 % [Ch][TES] + 30-45 % PPG 400 + 39-54 % FPSA.

Os dados experimentais das TLs determinadas experimentalmente e as respetivas TLLs encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados experimentais das TLs e TLLs dos SABs constituídos por [Ch][TES] + PPG 400 a 25 °C. As composições iniciais das misturas são representadas por [PPG]_M e [LI]_M, enquanto que [PPG]_{PPG} e [PPG]_{LI} representam a fração mássica de PPG 400 na fase maioritariamente constituída por PPG 400 e LI, respetivamente; e [LI]_{LI} e [LI]_{PPG} representam a fração mássica de LI na fase maioritariamente constituída por LI e PPG, respetivamente.

SAB	Frações mássicas (%)						TLL (%)
	[PPG] _{PPG}	[PPG] _{LI}	[PPG] _M	[LI] _M	[LI] _{LI}	[LI] _{PPG}	
[Ch][TES] 10 % + PPG 400 45 % + FPSA 45 %	74,16 ± 0,78	31,58 ± 0,05	44,61 ± 0,01	9,93 ± 0,01	12,84 ± 0,02	3,33 ± 0,08	43,63 ± 0,71
[Ch][TES] 10 % + PPG 400 40 % + FPSA 50 %	58,12 ± 0,63	35,06 ± 0,52	39,89 ± 0,15	10,17 ± 0,11	11,41 ± 0,20	5,47 ± 0,11	23,81 ± 1,19
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 45 % + FPSA 39 %	88,79 ± 2,45	12,59 ± 0,69	45,04 ± 0,08	15,96 ± 0,03	26,29 ± 0,77	2,09 ± 0,17	79,96 ± 1,50
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 40 % + FPSA 44 %	87,98 ± 2,53	16,05 ± 0,08	39,89 ± 0,18	15,93 ± 0,10	22,77 ± 0,07	2,15 ± 0,18	74,84 ± 2,39
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 35 % + FPSA 49 %	90,03 ± 6,90	19,63 ± 0,80	34,83 ± 0,07	15,92 ± 0,06	19,80 ± 0,60	2,04 ± 0,46	72,62 ± 5,87
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 30 % + FPSA 54 %	85,21 ± 4,56	21,77 ± 0,36	29,92 ± 0,01	16,19 ± 0,03	18,25 ± 0,24	2,36 ± 0,35	65,41 ± 4,10

Após a análise das fases dos SABs por HPLC, determinou-se o K_{IgY} , EE_{IgY} (%), $Pureza_{IgY}$ (%) e $Rendimento_{IgY}$ (%) da IgY (Tabela 10).

Tabela 10 - Coeficiente de partição (K_{IgY}), eficiência de extração (EE_{IgY} (%)), pureza ($Pureza_{IgY}$ (%)) e rendimento ($Rendimento_{IgY}$ (%)) da IgY nas fases inferiores dos SABs constituídos por 10 e 16 % [Ch][TES] + 30-45 % PPG 400 + 39-54 % FPSA a 25 °C.

SAB	Pureza _{IgY} (%) na fase inferior	Rendimento _{IgY} (%) na fase inferior	K_{IgY}	EE_{IgY} (%)
[Ch][TES] 10 % + PPG 400 45 % + FPSA 45 %	43,52 ± 1,92	78,47 ± 0,44	7,59 ± 2,08	87,64 ± 2,99
[Ch][TES] 10 % + PPG 400 40 % + FPSA 50 %	36,10 ± 9,27	67,15 ± 9,78	7,76 ± 3,21	85,54 ± 1,34
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 45 % + FPSA 39 %	43,65 ± 1,79	84,68 ± 5,63	10,09 ± 0,39	90,97 ± 0,31
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 40 % + FPSA 44 %	43,07 ± 1,36	77,99 ± 11,49	14,37 ± 10,16	91,67 ± 5,50
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 35 % + FPSA 49 %	42,92 ± 1,33	80,40 ± 9,25	11,01 ± 4,23	91,12 ± 3,13
[Ch][TES] 16 % + PPG 400 30 % + FPSA 54 %	25,79 ± 2,46	54,77 ± 8,74	6,81 ± 3,59	85,68 ± 6,58

Mais uma vez se confirma a elevada afinidade das proteínas para a fase de LI, uma vez que se obtêm valores de EE_{IgY} (%) entre 86 – 92 % e os K_{IgY} encontraram-se entre 7 – 14. O rendimento da IgY nas fases inferiores variou entre 55 – 85 %, ocorrendo ainda um aumento do grau de pureza nas fases inferiores que atinge os 44%. Foi ainda realizado SDS-PAGE das fases resultantes dos SABs constituídos por 10 e 16 % [Ch][TES] + 30-45 % PPG 400 + 39-54 % FPSA, cujos resultados se encontram na Figura 13.

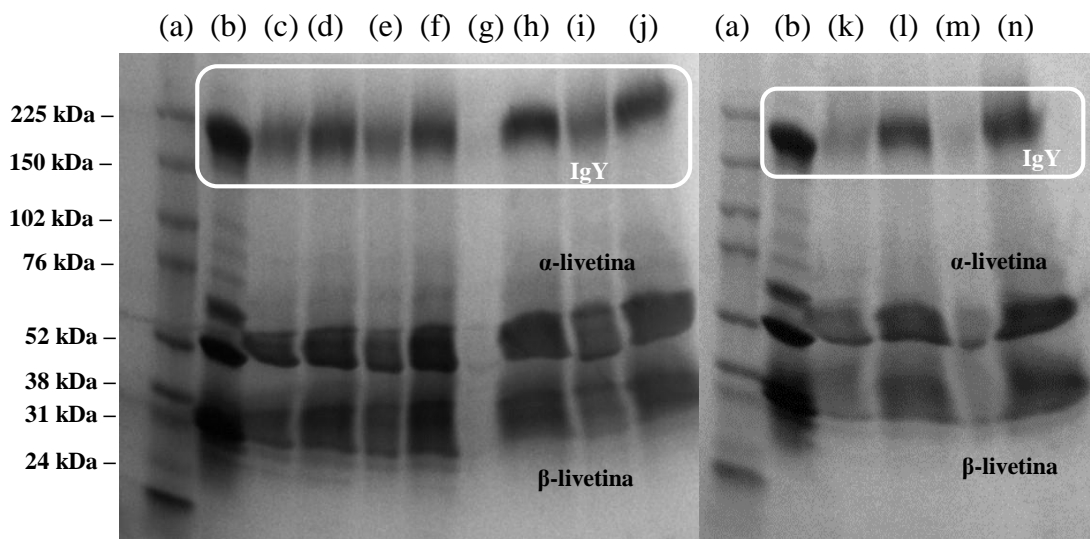


Figura 13 - SDS-PAGE em condições semi-nativas corado com azul de Coomassie, realizado após a purificação da IgY com SABs constituídos por 10 e 16 % [Ch][TES] + 30-45 % PPG 400 + 39-54 % FPSA

Poço (a) – Marcador de peso molecular

Poço (b) – FPSA

Poços (c) e (d) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 10 % [Ch][TES] + 45 % PPG 400 + 45 % FPSA, respetivamente

Poços (e) e (f) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 10 % [Ch][TES] + 40 % PPG 400 + 50 % FPSA, respetivamente

Poços (g) e (h) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 16 % [Ch][TES] + 45 % PPG + 39 % FPSA, respetivamente

Poços (i) e (j) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 16 % [Ch][TES] + 40 % PPG 400 + 44 % FPSA, respetivamente

Poços (k) e (l) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 16 % [Ch][TES] + 35 % PPG + 49 % FPSA, respetivamente

Poços (m) e (n) – Fases superior e inferior do SAB constituído por 16 % [Ch][TES] + 30 % PPG 400 + 54 % FPSA, respetivamente

Verificou-se que a variação da fração mássica de [Ch][TES] e a diminuição da fração mássica de PPG 400 permitiu que ocorresse um aumento do teor de proteínas contaminantes nas fases superiores dos SABs (poços (c), (e), (i), (k) e (m)), aumentando assim o grau de pureza nas fases inferiores. Ocorreu também uma perda de IgY para a fase superior, contudo é visível que o teor de IgY continua a ser superior nas fases inferiores dos SABs (maioritariamente constituídas por LI). Neste SDS-PAGE verificou-se ainda que a fase superior do SAB constituído por 16 % [Ch][TES], 45 % PPG e 39 % FPSA (poço (g)) não apresentou um teor significativo de proteínas. Assim sendo, a fase inferior deste SAB será constituída por um maior teor em IgY, contudo retém-se também as proteínas contaminantes

nesta fase.

Em suma, verificou-se que para qualquer dos pontos de mistura estudados, a IgY encontra-se maioritariamente na fase inferior dos SABs, uma vez que possui uma maior afinidade com os LIs hidrofílicos. No entanto, a α - e β -livetina apresentam um grau de hidrofiliidade semelhante ao da IgY e deste modo encontram-se também maioritariamente presentes na fase inferior dos SABs, impossibilitando a obtenção de elevados fatores de pureza. Dos pontos de mistura estudados inicialmente (7-10 % [Ch][GB]-LIs, 50 % PPG 400 e 40-43 % FPSA), verificou-se que os melhores resultados decorriam da utilização de [Ch][TES] e [Ch][Tricine]. Com a utilização destes LIs obtiveram-se rendimentos de IgY na ordem dos 80 % com eficiências de extração de cerca de 90 %, embora os fatores de pureza sejam insuficientes (27 %). Posteriormente, definiram-se novos pontos de mistura ao longo da região bifásica do diagrama de fases do [Ch][TES] (10-20 % [Ch][TES], 50 % PPG 400 e 30-40 % FPSA) para avaliar a importância da variação da fração mássica de LI. Com esta abordagem, o rendimento de IgY variou entre 67 - 95 % e pureza não ultrapassou os 35 %. Procedeu-se então à definição de novos pontos de mistura em que se variasse a fração mássica de [Ch][TES] e PPG 400 ao longo da região bifásica (10 e 16 % [Ch][TES], 30 - 45 % PPG 400 e 39 - 54 % FPSA). Com esta abordagem, atingiram-se os 44% de pureza, obtendo-se ainda rendimentos de IgY entre 55 - 85 %, sendo que os valores de eficiência de extração variaram entre 86 - 92 %. Os resultados de SDS-PAGE para as fases resultantes destes SABs revelam um aumento de α - e β -livetina na fase superior dos sistemas, explicando assim o aumento dos fatores de pureza nas fases inferiores. Conclui-se que dos pontos de mistura estudados, o mais promissor no âmbito na purificação da IgY é constituído por 16 % [Ch][TES], 45 % PPG 400 e 39 % FPSA, obtendo-se um rendimento de IgY na fase inferior de 85 % com 44 % de pureza. É então evidente que o grau de pureza obtido neste processo é insuficiente para que a IgY possa ser utilizada como um biofármaco, e a presença de α - e β -livetina poderão afetar a capacidade imunológica do anticorpo. Também os processos intrínsecos à purificação de biomoléculas estão muitas vezes associados a uma perda de atividade e estabilidade de proteínas, pelo que se deve avaliar a atividade e estabilidade da biomolécula após o processo.

3.2. Avaliação da atividade e estabilidade da IgY em soluções aquosas de polímeros, sais e LIs

Os anticorpos são agentes terapêuticos que se devem encontrar na sua conformação nativa, de forma a preservar a sua atividade. Para além de ser necessário manter a sua estabilidade, os anticorpos devem apresentar um elevado grau de pureza para desempenharem as suas funções (revisto em [5,60]). Assim sendo, é necessária a avaliação da atividade e estabilidade da IgY após os processos de extração e purificação, neste caso após a utilização de SABs. Os SABs são formados por combinações de polímeros, sais e LIs; consequentemente, o estudo da atividade e estabilidade da IgY em soluções com estes constituintes permite inferir sobre os efeitos desta técnica na extração e purificação de proteínas.

Para esta análise realizaram-se diversas técnicas de modo a concluir se ocorre a preservação da estrutura secundária e terciária da IgY, bem como da sua reatividade em soluções aquosas de polímeros, sais e LIs. Os métodos de imunodeteção (baseados na interação antígeno-anticorpo), nomeadamente as técnicas de ELISA e *Western Blot*, permitem avaliar indiretamente se um anticorpo se encontra biologicamente ativo e funcional, caso reconheça o antígeno [53,54]. A monitorização do comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção do anticorpo na região dos 200-400 nm permite inferir sobre possíveis alterações na estrutura terciária da proteína [51,52]. Pode-se ainda inferir sobre a estabilidade das proteínas através da sua estrutura secundária, nomeadamente através de técnicas baseadas na interação com luz polarizada, como o Dicroísmo Circular (DC). Desta forma, caso ocorram alterações na proteína que comprometam a sua estabilidade conformacional e consequentemente a sua funcionalidade, os espectros obtidos nestes tipos de análises serão diferentes [50]. Nesta secção, seguem-se os estudos da atividade e estabilidade da IgY em soluções de sais, polímeros e LIs recorrendo às técnicas mencionadas acima.

3.2.1. Western Blot da IgY em soluções de polímeros

Realizou-se *Western Blot* para avaliar se a IgY em soluções de polímeros preserva a capacidade de reconhecer o anticorpo anti-IgY, cujos resultados se encontram na Figura 14.

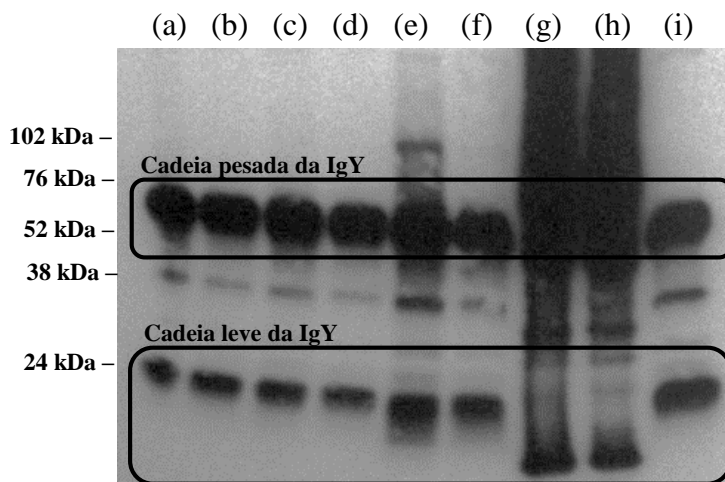


Figura 14 - *Western Blot* da IgY em soluções de polímeros, obtido a partir da transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE realizado em condições desnaturantes.

Poço (a) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 600 12,5 %
Poço (b) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 600 7,5 %
Poço (c) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 400 12,5 %
Poço (d) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 400 7,5 %
Poço (e) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 200 12,5 %
Poço (f) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 200 7,5 %
Poço (g) – IgY 0,25 mg/mL em PPG 400 12,5 %
Poço (h) – IgY 0,25 mg/mL em PPG 400 7,5 %
Poço (i) – IgY pura 0,50 mg/mL

Verifica-se que a IgY preserva a sua atividade em soluções de polímeros, uma vez que as cadeias pesada e leve do anticorpo reconhecem o anti-IgY. É também visível que o anticorpo secundário tem a capacidade de ligação à β -livetina, o que poderá ser explicado pelo facto de o anticorpo ser do tipo policlonal e consequentemente é possível ligar-se a múltiplos epítomos do antígeno. Em geral, não se verificam diferenças significativas na intensidade da marcação dependendo da concentração do polímero. No entanto, uma maior concentração de PEG 200 implicou o surgimento de uma banda a 100 kDa, que poderá resultar de processos de instabilidade da IgY, nomeadamente resultantes de interações anticorpo-anticorpo. Em polímeros como o PPG 400 observa-se um maior arrastamento das bandas, o que se verifica também nos resultados do SDS-PAGE realizado como controlo do *Western Blot* (Figura 15).

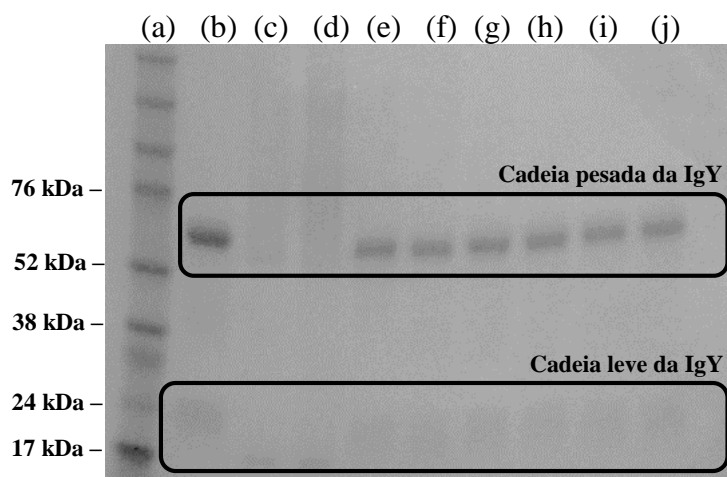


Figura 15 - SDS-PAGE em condições desnaturantes realizado com a IgY em várias soluções de polímeros para controlo do *Western Blot*.

Poço (a) – Marcador de peso molecular

Poço (b) – IgY pura 0,5 mg/mL

Poço (c) – IgY 0,25 mg/mL em PPG 400 7,5 %

Poço (d) – IgY 0,25 mg/mL em PPG 400 12,5 %

Poço (e) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 200 7,5 %

Poço (f) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 200 12,5 %

Poço (g) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 400 7,5 %

Poço (h) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 400 12,5 %

Poço (i) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 600 7,5 %

Poço (j) – IgY 0,25 mg/mL em PEG 600 12,5 %

O efeito de um polímero numa proteína depende do tipo de polímero e da proteína em questão, mas também do seu peso molecular, concentração e volume de exclusão. Os polímeros de menor peso molecular são agentes com menor capacidade de precipitação de proteínas do que os polímeros de maior peso molecular [96]. Os polímeros estudados apresentam um peso molecular de 200-600 g.mol⁻¹, logo não se prevê um elevado poder precipitante e podem ser considerados de carácter hidrofílico. Contudo, até mesmo o PEG 6000 apresentou um efeito negligível na desnaturação de RNase e mioglobina [97]. As diferenças estruturais entre o PEG e o PPG atribuem-se simplesmente ao facto de que o PPG possui um grupo metilo adicional, logo é ligeiramente mais hidrofóbico (Figura 16).

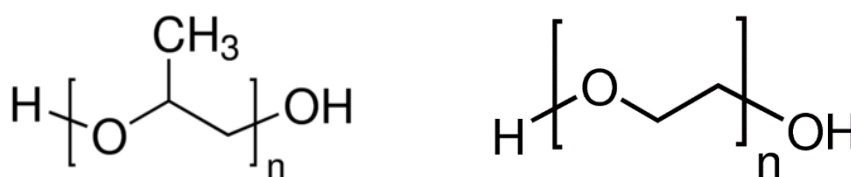


Figura 16 - Estruturas químicas do PPG (à esquerda) e do PEG (à direita).

3.2.2. Western Blot da IgY em soluções de sais

Realizou-se *Western Blot* para avaliar se a IgY em soluções de sais preserva a capacidade de reconhecer o anticorpo anti-IgY, cujos resultados se encontram na Figura 17.

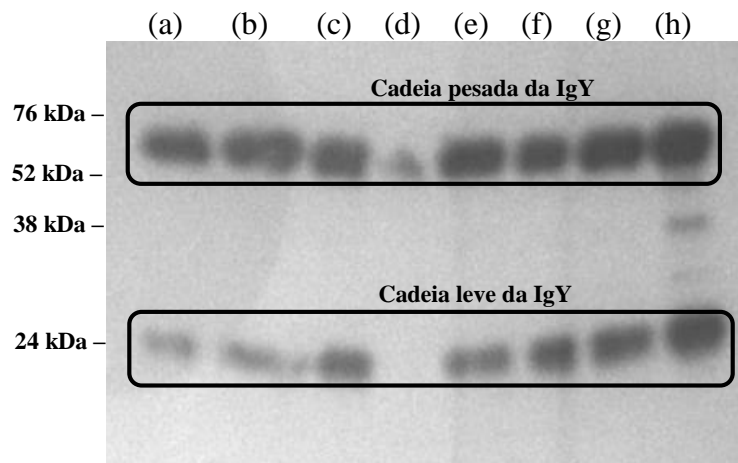


Figura 17 - *Western Blot* da IgY em soluções de sais, obtido a partir da transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE realizado em condições desnaturantes.

Poço (a) – IgY 0,25 mg/mL em fosfato de sódio 2,5 %

Poço (b) – IgY 0,25 mg/mL em citrato de sódio 7,5 %

Poço (c) – IgY 0,25 mg/mL em citrato de sódio 2,5 %

Poço (d) – IgY 0,25 mg/mL em carbonato de sódio 2,5 %

Poço (e) – IgY 0,25 mg/mL em sulfato de sódio 5 %

Poço (f) – IgY 0,25 mg/mL em sulfato de sódio 2,5 %

Poço (g) – IgY 0,25 mg/mL em cloreto de sódio 2,5 %

Poço (h) – IgY pura 0,50 mg/mL

Verifica-se que, em geral, a IgY em soluções de sais também preserva a sua atividade. No entanto, o carbonato de sódio afeta a atividade do anticorpo, não sendo possível reconhecer a cadeia leve da IgY na presença deste sal. Os resultados do SDS-PAGE demonstram a perda significativa do anticorpo na solução de carbonato de sódio (Figura 18).

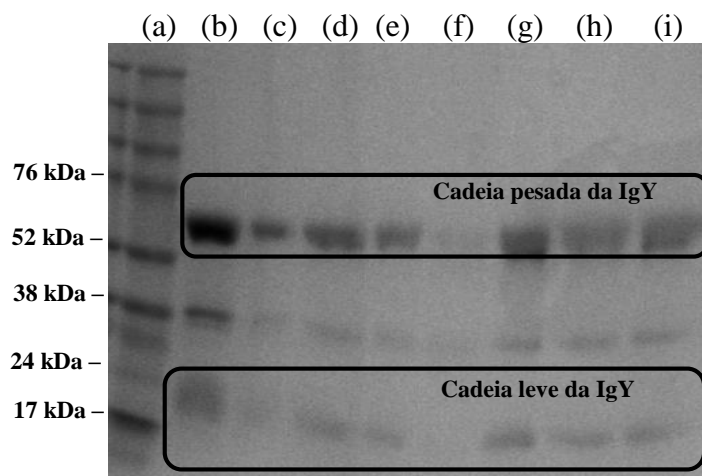


Figura 18 - SDS-PAGE em condições desnaturantes realizado com a IgY em várias soluções de sais para controle do *Western Blot*.

Poço (a) – Marcador de peso molecular

Poço (b) – IgY pura 0,5 mg/mL

Poço (c) – IgY 0,25 mg/mL em cloreto de sódio 2,5 %

Poço (d) – IgY 0,25 mg/mL em sulfato de sódio 2,5 %

Poço (e) – IgY 0,25 mg/mL em sulfato de sódio 5 %

Poço (f) – IgY 0,25 mg/mL em carbonato de sódio 2,5 %

Poço (g) – IgY 0,25 mg/mL em citrato de sódio 2,5 %

Poço (h) – IgY 0,25 mg/mL em citrato de sódio 7,5 %

Poço (i) – IgY 0,25 mg/mL em fosfato de sódio 2,5 %

Os sais estudados têm em comum o catião selecionado (sódio) e diferentes aniões (cloreto, sulfato, carbonato, citrato e fosfato) para testar o possível efeito da série de Hofmeister [98] na atividade do anticorpo. Ainda não se consegue interpretar inequivocamente os efeitos da série de Hofmeister nas proteínas, uma vez que existe uma interação complexa entre iões, moléculas de água e proteína (revisto em [99]). Os iões dos sais interagem com as moléculas de água, ocorrendo ainda uma interação direta com as proteínas através de forças eletrostáticas. A série de Hofmeister classifica os iões de acordo com a propensão para desencadear os efeitos de *salting out* ou *salting in* de proteínas, sendo que o anião tem um efeito mais notório na solubilidade das proteínas do que o catião, uma vez que é mais polarizado e hidratável [100]. Os iões cosmotrópicos são hidratáveis, contrariamente aos iões caotrópicos. De acordo com estudos testando a série de Hofmeister [101,102], o cloreto de sódio seria o sal que proveria maior estabilidade, seguido do citrato de sódio, fosfato de sódio, sulfato de sódio e carbonato de sódio. Segundo os resultados do *Western Blot* (Figura 17), a atividade da IgY na solução de carbonato de sódio não é

preservada, uma vez que o carbonato se trata de um anião cosmotrópico que estabelece pontes de hidrogénio com a água, diminuindo assim a solubilidade da proteína em solução (*salting-out*).

3.2.3. Western Blot da IgY em soluções de LIs

Realizou-se *Western Blot* para avaliar se a IgY em soluções de LIs preserva a capacidade de reconhecer o anticorpo anti-IgY, cujos resultados se encontram na Figura 19.

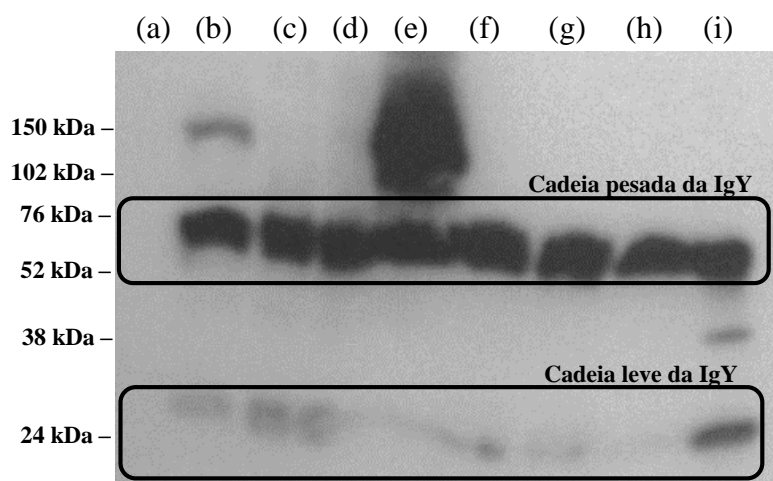


Figura 19 - *Western Blot* da IgY em soluções de LIs, obtido a partir da transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE realizado em condições desnaturantes.

Poço (a) – IgY 0,25 mg/mL em $[N_{4444}]Cl$ 12,5 %
 Poço (b) – IgY 0,25 mg/mL em $[Ch][Ac]$ 12,5 %
 Poço (c) – IgY 0,25 mg/mL em $[C_4mim][CF_3SO_3]$ 12,5 %
 Poço (d) – IgY 0,25 mg/mL em $[C_4mim]Cl$ 12,5 %
 Poço (e) – IgY 0,25 mg/mL em $[Ch][HEPES]$ 12,5 %
 Poço (f) – IgY 0,25 mg/mL em $[Ch][Tricine]$ 12,5 %
 Poço (g) – IgY 0,25 mg/mL em $[Ch][MES]$ 12,5 %
 Poço (h) – IgY 0,25 mg/mL em $[Ch][TES]$ 12,5 %
 Poço (i) – IgY pura 0,5 mg/mL

Verifica-se que, em geral, a IgY em soluções de LIs também preserva a sua atividade. No entanto, a IgY na solução de $[N_{4444}]Cl$ não foi reconhecida pelo anticorpo secundário, uma vez que o LI precipitou o tampão da amostra para a realização de SDS-PAGE. A cadeia leve do anticorpo indica-nos inequivocamente a presença da IgY, uma vez que a cadeia pesada apresenta um peso molecular semelhante ao de outras livetinas presentes na FPSA, nomeadamente a α -livetina (70 kDa). Em geral, observa-se um ténue reconhecimento da cadeia leve relativamente à cadeia pesada. Esta observação do ponto de vista biológico sugere perda de atividade desta cadeia e consequentemente poderá ocorrer uma diminuição

da eficácia da IgY quando utilizada como um biofármaco. Nas soluções de IgY em [Ch][Ac] e [Ch][HEPES], verificou-se a presença de sinal a um peso molecular elevado que poderá ser proveniente de processos de instabilidade, nomeadamente interações anticorpo-anticorpo (agregação) ou interações LI-anticorpo. É possível que os aminoácidos hidrofóbicos do anticorpo consigam interagir com os LIs, resultando na exclusão de algumas moléculas de água na região desses resíduos que interagem com o LI. Por outro lado, geralmente as moléculas hidrofílicas do anticorpo, não conseguem interagir com o LI [103]. A técnica de *Western Blot* é bastante sensível e, deste modo, o sinal inespecífico a um peso molecular elevado não foi observado quando corado o gel de SDS-PAGE com Coomassie (Figura 20).

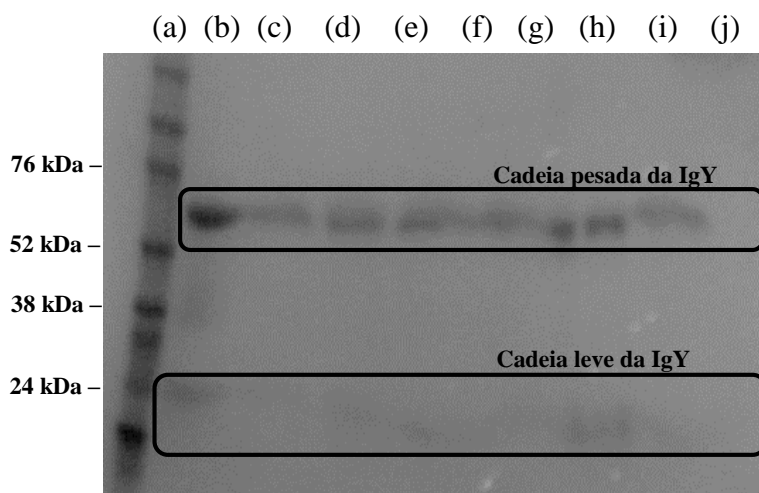


Figura 20 - SDS-PAGE em condições desnaturantes realizado com a IgY em várias soluções de LIs para controlo do *Western Blot*.

Poço (a) – Marcador de peso molecular

Poço (b) – IgY 0,5 mg/mL

Poço (c) – IgY 0,25 mg/mL em [Ch][TES] 12,5 %

Poço (d) – IgY 0,25 mg/mL em [Ch][MES] 12,5 %

Poço (e) – IgY 0,25 mg/mL em [Ch][Tricine] 12,5 %

Poço (f) – IgY 0,25 mg/mL em [Ch][HEPES] 12,5 %

Poço (g) – IgY 0,25 mg/mL em [C₄mim]Cl 12,5 %

Poço (h) – IgY 0,25 mg/mL em [C₄mim][CF₃SO₃] 12,5 %

Poço (i) – IgY 0,25 mg/mL em [Ch][Ac] 12,5 %

Poço (j) – IgY 0,25 mg/mL em [N₄₄₄₄]Cl 12,5 %

Os LIs utilizados neste estudo são considerados hidrofílicos, pelo que pode ocorrer, a determinadas concentrações, uma dissociação parcial ou total do LI em soluções aquosas e consequentemente alterar o pH da solução, contribuindo para que ocorra um decréscimo na estabilidade do anticorpo [104]. Este facto poderá explicar os sinais observados da IgY

nas soluções de [Ch][Ac] e [Ch][HEPES], uma vez que se tratam de LIs de carácter hidrofílico. Contudo, não se observaram sinais inespecíficos na IgY em soluções de LIs de carácter mais hidrofílico do que a [Ch][Ac] e [Ch][HEPES], como é o caso do [C₄mim]Cl.

Os LIs também seguem a série de Hofmeister, sendo que de entre os catiões [Ch]⁺ e [C₄mim]⁺, o [C₄mim]⁺ é mais cosmotrópico do que o colínio, e é até mais cosmotrópico do que o Na⁺ [105]. No entanto, apesar de o [C₄mim]⁺ ser um catião hidratável e que poderia diminuir a solubilidade da proteína em solução, nos resultados de *Western Blot* não surgem sinais inespecíficos da IgY na presença deste catião e na literatura verifica-se que a *horseradish* peroxidase retém mais de 90 % da sua atividade em SABs constituídos por [C₄mim]Cl [106]. De um modo geral, tem-se verificado na literatura que os catiões cosmotrópicos e aniões caotrópicos estabilizam as enzimas, enquanto que catiões caotrópicos e aniões cosmotrópicos destabilizam-nas (revisto em [99]). O [Ch][Ac] e [Ch][HEPES] são constituídos por catiões caotrópicos e por aniões cosmotrópicos e verificaram-se sinais inespecíficos que poderão resultar de processos de instabilidade da proteína (Figura 4 e 21).

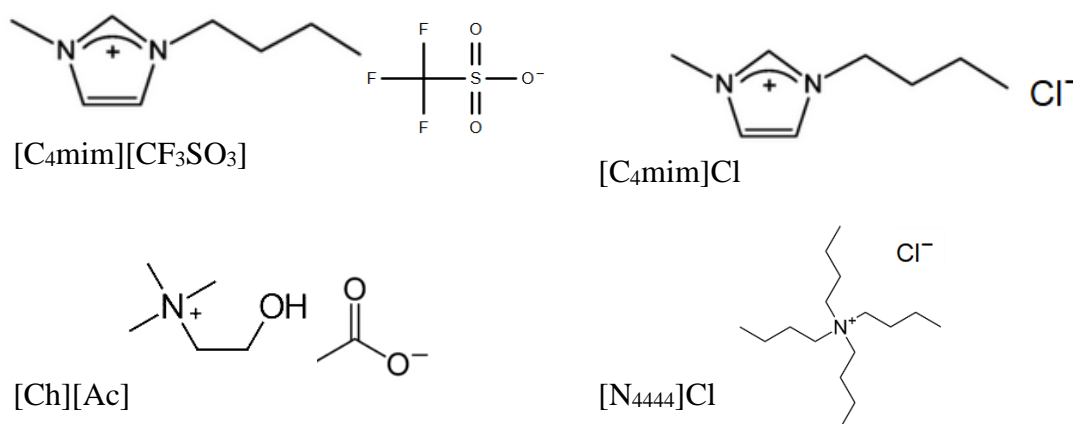


Figura 21 - Representação das estruturas dos LIs [C₄mim][CF₃SO₃], [C₄mim]Cl, [Ch][Ac] e [N₄₄₄₄]Cl.

3.2.4. ELISA

Utilizou-se a técnica de ELISA do tipo sanduíche como um método quantitativo de avaliação da atividade da IgY nas soluções estudadas. A partir da média dos valores de absorvância a 450 nm dos padrões construiu-se uma curva de calibração do tipo logarítmico (Figura 22).

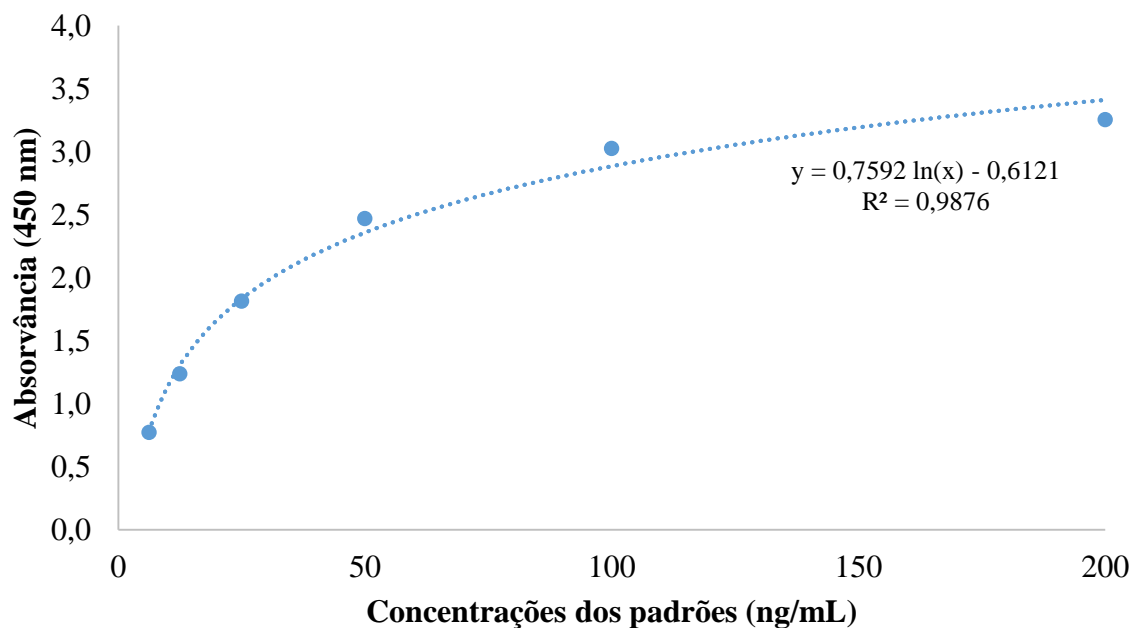


Figura 22 - Curva de calibração ajustada aos valores de absorvância a 450 nm em função da concentração dos padrões (6,25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL).

A quantificação da IgY nas amostras pode ser interpolada através da curva de calibração construída a partir dos padrões e permite inferir sobre a quantidade de anticorpo reativo nas várias soluções. Os valores de concentração da IgY reconhecida nas soluções de polímeros, sais e LIs encontram-se nas Figuras 23, 24 e 25, respetivamente.

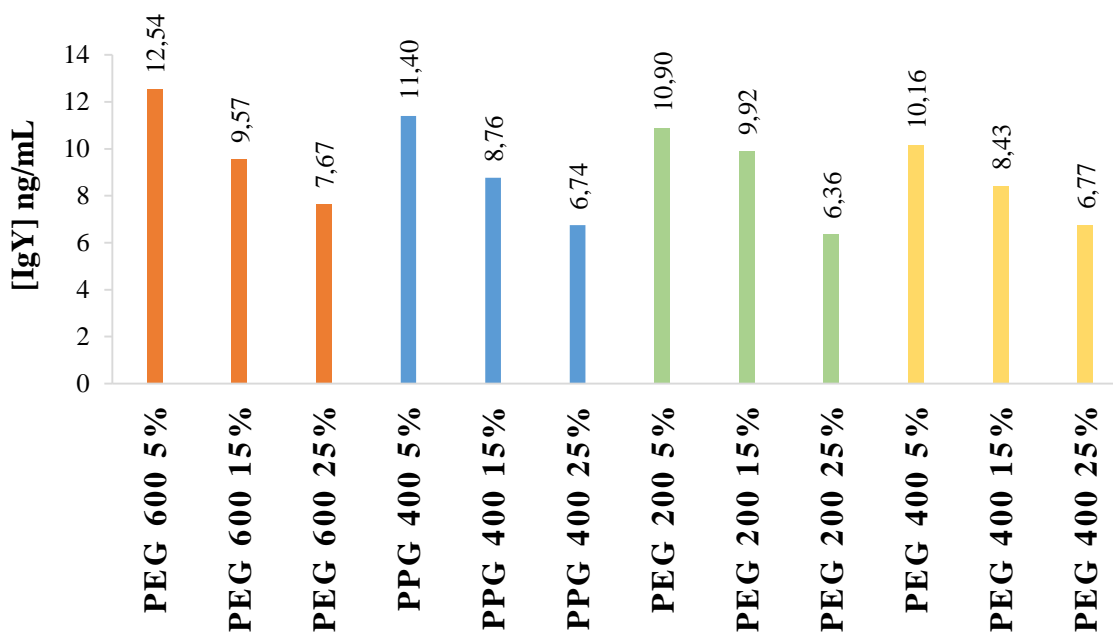


Figura 23 - Representação gráfica dos valores de concentração de IgY reconhecida em soluções aquosas de polímeros.

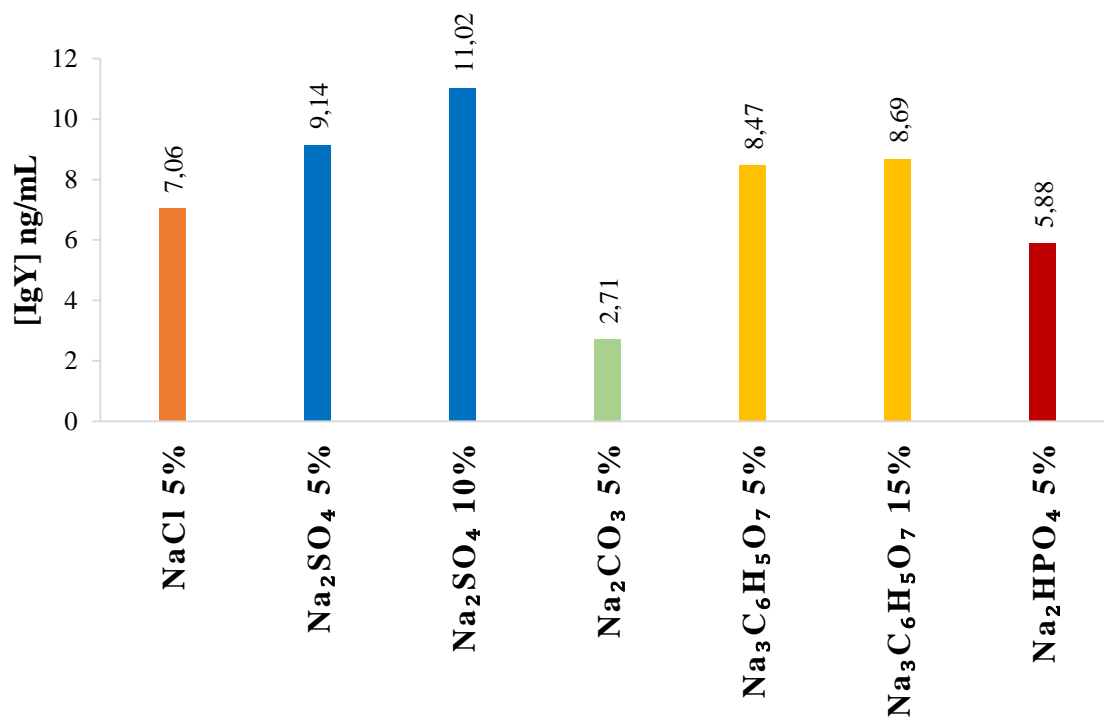


Figura 24 - Representação gráfica dos valores de concentração de IgY reconhecida em soluções aquosas de sais.

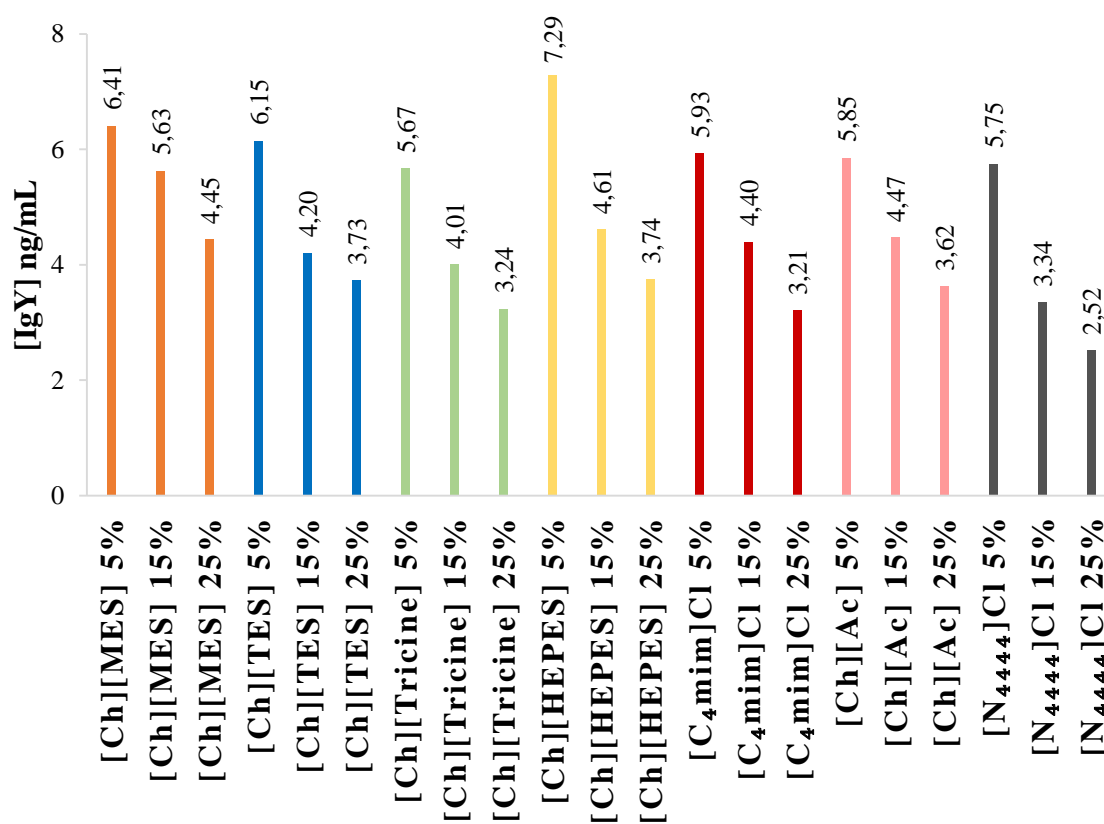


Figura 25 - Representação gráfica dos valores de concentração de IgY reconhecida em soluções aquosas de LIs.

De um modo geral, a IgY surge com mais atividade nas soluções aquosas de polímeros, seguido dos sais e LIs. É ainda evidente que a atividade da IgY diminui com o aumento da concentração de polímero ou LI. Contudo, a IgY na presença de 10% de sulfato de sódio é mais reconhecida do que na presença de 5% de sulfato de sódio. Dos sais estudados (Figura 24), destaca-se o carbonato de sódio como aquele que afeta negativamente a atividade da IgY, o que corrobora os resultados do *Western Blot* (Figura 17) e a tendência da série de Hofmeister. Por outro lado, o sulfato de sódio é o sal que permite o maior reconhecimento da IgY, seguindo-se o citrato de sódio, o cloreto de sódio e o fosfato de sódio. Estes resultados não seguem totalmente a série de Hofmeister [101,102], que coloca o cloreto de sódio como o sal mais estabilizante, seguido do citrato de sódio, fosfato de sódio, sulfato de sódio. Relativamente aos polímeros (Figura 23), verifica-se que o PEG 600 é o que permite uma maior preservação da atividade da IgY, quer quando comparado a outros polímeros, quer quando comparado com as soluções de sais ou LIs. Desta forma, pode considerar-se que a utilização de PEG 600 na utilização de SABs de modo a purificar a IgY é mais biocompatível quando comparada com os outros constituintes de SABs estudados. Dentro da classe dos polímeros, o PPG 400 também apresenta uma boa capacidade de preservação da atividade da IgY, sendo que foi o polímero utilizado no âmbito da purificação da IgY neste trabalho. Seria expectável que os polímeros de menor peso molecular apresentassem um menor poder precipitante, logo um maior poder estabilizante sob as proteínas. Contudo, o PEG 600 esteve associado a um maior reconhecimento da IgY, seguido do PEG 200 e PEG 400, não se verificando um seguimento crescente de reconhecimento da IgY consoante o peso molecular de PEG. Dos LIs estudados (Figura 25), o [Ch][HEPES] a 5% foi o que melhor permitiu a preservação da atividade da IgY, seguido do [Ch][MES] 5%, [Ch][TES] 5%, [C₄mim]Cl 5%, [Ch][Ac] 5%, [N₄₄₄₄]Cl 5% e [Ch][Tricine] 5%. Verifica-se assim que dos LIs estudados, os utilizados no âmbito da purificação apresentam uma preservação satisfatória da atividade da IgY. Previamente já se tinha reportado que os LIs [Ch][HEPES], [Ch][MES], [Ch][TES] e [Ch][Tricine] preservavam a estrutura da BSA [107]. Embora se tenham verificado sinais inespecíficos a elevados pesos moleculares para a [Ch][Ac] e [Ch][HEPES] nos resultados de *Western Blot* (Figura 19), a atividade preserva-se; e em particular, no caso do [Ch][HEPES] é bastante satisfatória. Contatou-se ainda que um aumento da concentração de [N₄₄₄₄]Cl conduz a uma diminuição significativa do reconhecimento da IgY, sendo que se verificou o menor

reconhecimento da IgY em [N₄₄₄₄]Cl 25%, relativamente aos LIs estudados e também aos polímeros e sais. Verifica-se ainda que a IgY em concentrações crescentes de [Ch][MES] não perde a sua atividade de modo tão abrupto relativamente a outros LIs. Conclui-se assim que os solventes não polares como os polímeros em solução aquosa, estão associados a uma maior preservação da atividade da IgY. Por outro lado, os solventes polares como os sais e os LIs em solução aquosa estão associados a uma menor preservação da atividade do anticorpo.

3.2.5. Monotorização do comprimento de onda correspondente à absorvância máxima das soluções

A monotorização do comprimento de onda máximo na região dos 200-400 nm pode permitir inferir sobre certos aspetos da estrutura terciária da proteína, de acordo com os resíduos aromáticos (absorvem a 260-320 nm), as ligações peptídicas (absorvem a <240 nm) e as ligações dissulfureto (absorvem a ~260 nm), que atuam como cromóforos (revisto em [51]). O anel aromático da fenilalanina absorve aos 260 nm, enquanto que o triptofano e a tirosina absorvem na região dos 280 nm [108]. Os fatores como o pH, temperatura, força iónica, agentes desnaturantes, entre outros, enfraquecem as forças intramoleculares responsáveis pela conservação da estrutura terciária da proteína, alterando a capacidade de os resíduos aromáticos absorverem a 280 nm [52,108]

Os espectros na região UV foram registados no comprimento de onda 200-400 nm (Figuras 26-28), contudo registou-se um máximo de absorvância no intervalo de comprimento de onda 260-300 nm, cujo respetivo valor de comprimento de onda foi monotorizado.

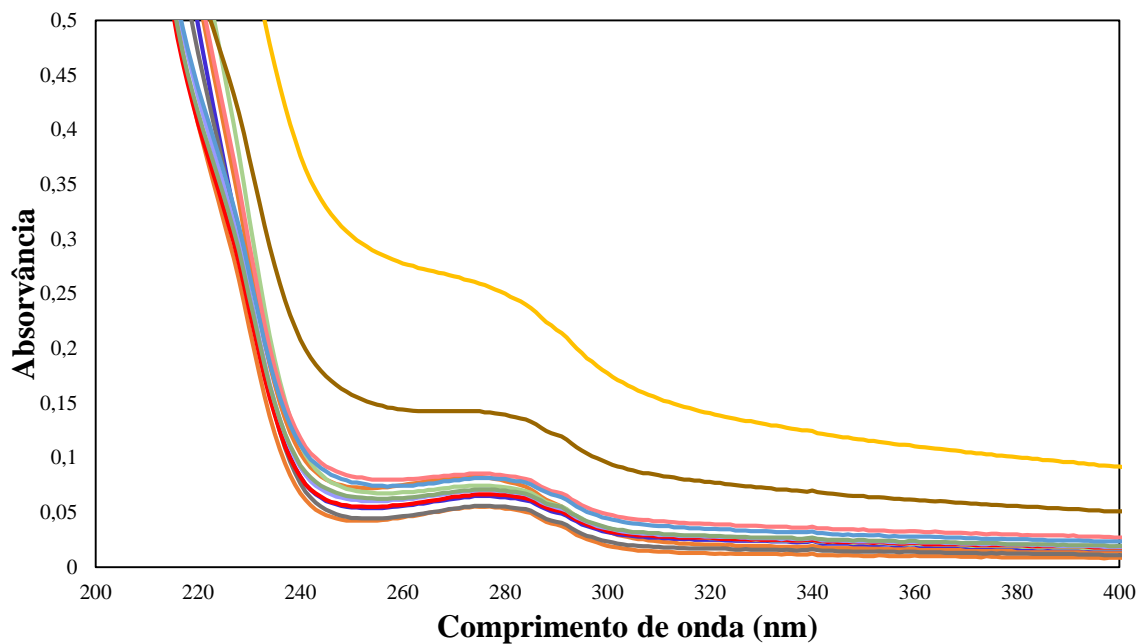


Figura 26 - Espectro na região 200-400 nm da IgY em várias soluções de polímeros: PPG 400 5% (—), PPG 400 15% (—), PPG 400 25% (—), PEG 200 5% (—), PEG 200 15% (—), PEG 200 25% (—), PEG 400 5% (—), PEG 400 15% (—), PEG 400 25% (—), PEG 600 5% (—), PEG 600 15% (—) e PEG 600 25% (—).

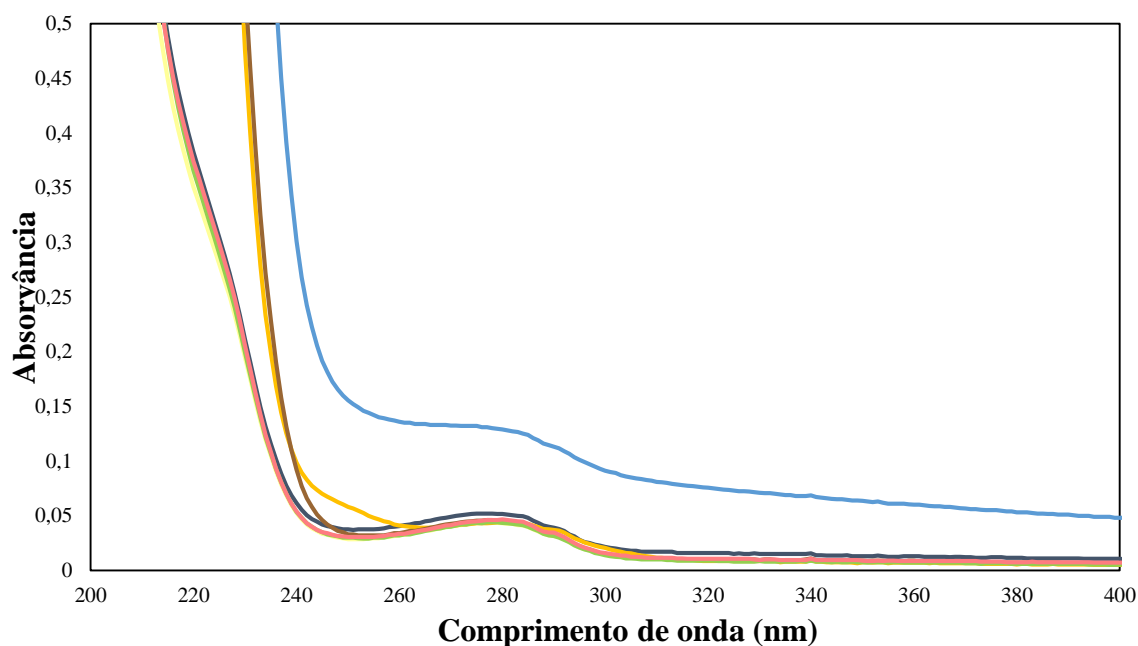


Figura 27 - Espectro na região 200-400 nm da IgY em várias soluções de sais: cloreto de sódio 5% (—), sulfato de sódio 5% (—), sulfato de sódio 10% (—), carbonato de sódio 5% (—), citrato de sódio 5% (—), citrato de sódio 15% (—) e fosfato de sódio 5% (—).

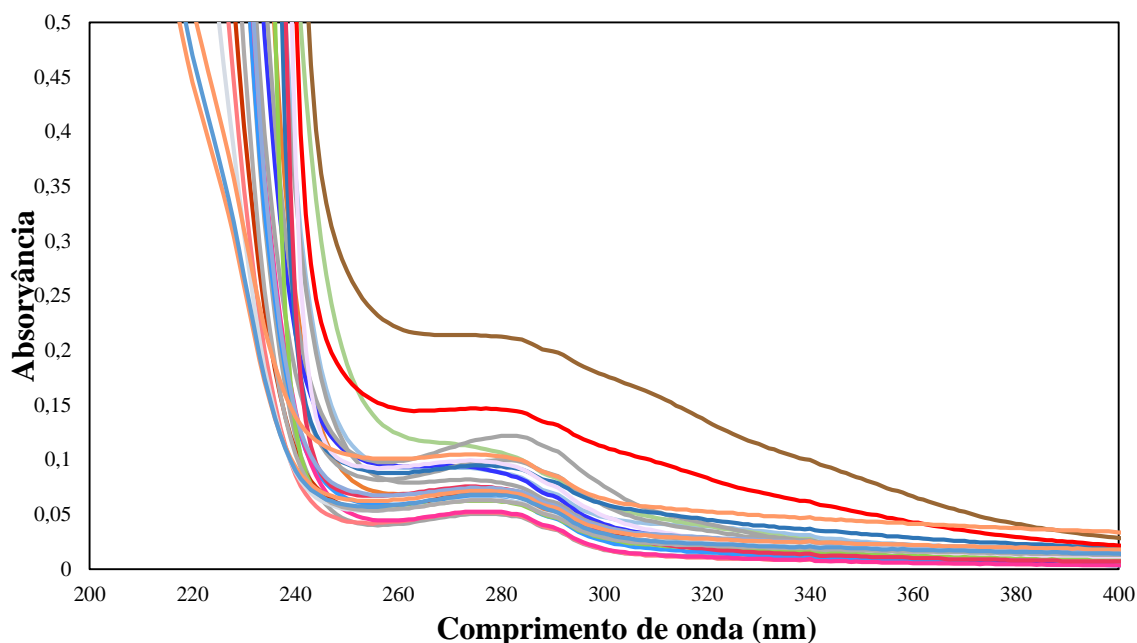


Figura 28 - Espectros na região 200-400 nm da IgY em várias soluções de LIs: [Ch][MES] 5% (—), [Ch][MES] 15% (—), [Ch][MES] 25% (—), [Ch][TES] 5% (—), [Ch][TES] 15% (—), [Ch][TES] 25% (—), [Ch][Tricine] 5% (—), [Ch][Tricine] 15% (—), [Ch][Tricine] 25% (—), [Ch][HEPES] 5% (—), [Ch][HEPES] 15% (—), [Ch][HEPES] 25% (—), [C₄mim]Cl 5% (—), [C₄mim]Cl 15% (—), [C₄mim]Cl 25% (—), [C₄mim][CF₃SO₃] 5% (—), [C₄mim][CF₃SO₃] 15% (—), [C₄mim][CF₃SO₃] 25% (—), [Ch][Ac] 5% (—), [Ch][Ac] 15% (—), [Ch][Ac] 25% (—), [N₄₄₄₄]Cl 5% (—), [N₄₄₄₄]Cl 15% (—) e [N₄₄₄₄]Cl 25% (—).

Verificou-se que a IgY em água regista o seu valor máximo de absorvância aos 277-279 nm, considerando-se o valor de 278 nm para efeitos comparativos. Os resultados da monitorização do comprimento de onda correspondentes ao máximo de absorção da IgY em soluções de polímeros, sais e LIs encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Registo dos valores dos comprimentos de onda correspondentes ao máximo de absorvância no intervalo 260-300 nm da IgY nas soluções de polímeros, sais e LIs.

λ_{IgY} em água = 278 nm								
Polímero	%	λ_{IgY} em polímero (nm)	Sal	%	λ_{IgY} em sal (nm)	LI	%	λ_{IgY} em LI (nm)
PPG 400	5	277	NaCl	5	280	[Ch][MES]	5	274-279
	15	272-275	Na ₂ SO ₄	5	275-278		15	270-275
	25	275		10	275-279		25	269-270
PEG 200	5	274-277	Na ₂ CO ₃	5	279-281	[Ch][TES]	5	274-277
	15	274-277	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	5	277-278		15	274
	25	273-277		15	277		25	269
PEG 400	5	274-278	Na ₂ HPO ₄	5	277-279	[Ch][Tricine]	5	273-280
	15	275-277					15	273-274
	25	273-277					25	274
PEG 600	5	274-278				[Ch][HEPES]	5	276-280
	15	274-277					15	279-282
	25	263-275					25	280-283
						[C ₄ mim]Cl	5	275, 278
							15	274-275, 277
							25	273
						[C ₄ mim][CF ₃ SO ₃]	5	273-279
							15	273-275
							25	274
						[Ch][Ac]	5	274-279
							15	274-278
							25	274-275
						[N ₄₄₄₄]Cl	5	273-275
							15	274-278
							25	274-279

Relativamente ao comportamento da IgY nas várias soluções, verifica-se que a proteína não altera significativamente o comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção na região 260-300 nm. Desta forma, a IgY não deverá sofrer alterações conformacionais significativas nas soluções aquosas de polímeros, sais e LIs.

3.2.6. Dicroísmo Circular (DC)

O Dicroísmo Circular (DC) tem como princípio a absorção desigual de luz polarizada, *left* and *right-handed*, por parte de moléculas opticamente ativas, uma vez que as proteínas possuem assimetria molecular/quiralidade (revisto em [51]). Na região UV-longínqua (190 - 250 nm), as ligações peptídicas das proteínas atuam como cromóforos, possibilitando a determinação da estrutura secundária. As proteínas contendo α -hélices na sua estrutura secundária apresentam valores negativos a 222 e 208 nm e valores positivos a 193 nm, as folhas- β serão identificadas por valores negativos a 218 nm e valores positivos a 195 nm, enquanto que as proteínas disfuncionais e instáveis apresentam baixa elipticidade a 210 nm e valores negativos a 195 nm, permitindo a sua identificação (Figura 29) [50].

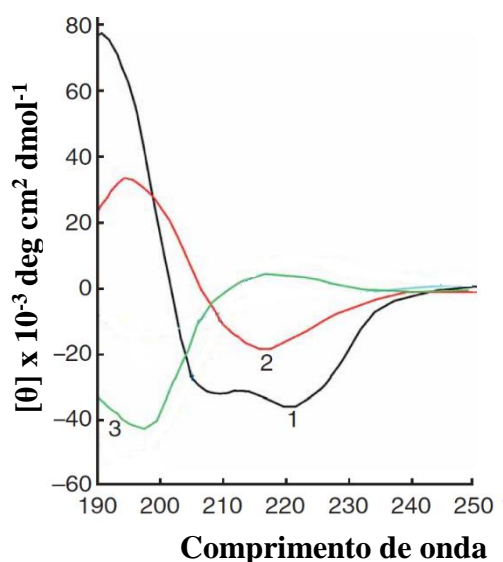


Figura 29 - Espectro de DC representativo de proteínas constituídas por α -hélices (curva 1), folhas β (curva 2) e conformação desenovelada (curva 3). Adaptado de Greenfield *et al.* [50].

Os espectros da IgY em soluções aquosas de polímeros, sais e LIs encontram-se nas Figuras 30, 31 e 32, respetivamente. Não foi possível obter espectros da IgY em LIs com colina e anéis imidazólio e em carbonato de sódio, uma vez que absorvem bastante na região UV-longínqua originando um elevado “ruído” nos espectros obtidos.

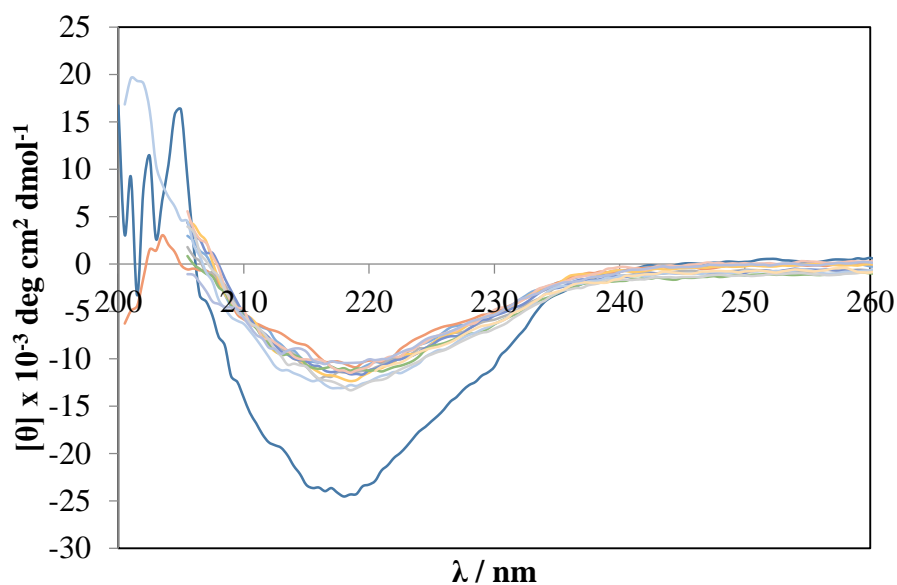


Figura 30 - Espectro de DC da IgY em soluções de polímeros: PEG 200 5 % (—), PEG 200 15 % (—), PEG 200 25 % (—), PEG 400 5% (—), PEG 400 15% (—), PEG 400 25% (—), PEG 600 5% (—), PEG 600 15% (—), PEG 600 25% (—), PPG 400 5% (—), PPG 400 15% (—), utilizando como controle a IgY em PBS (—).

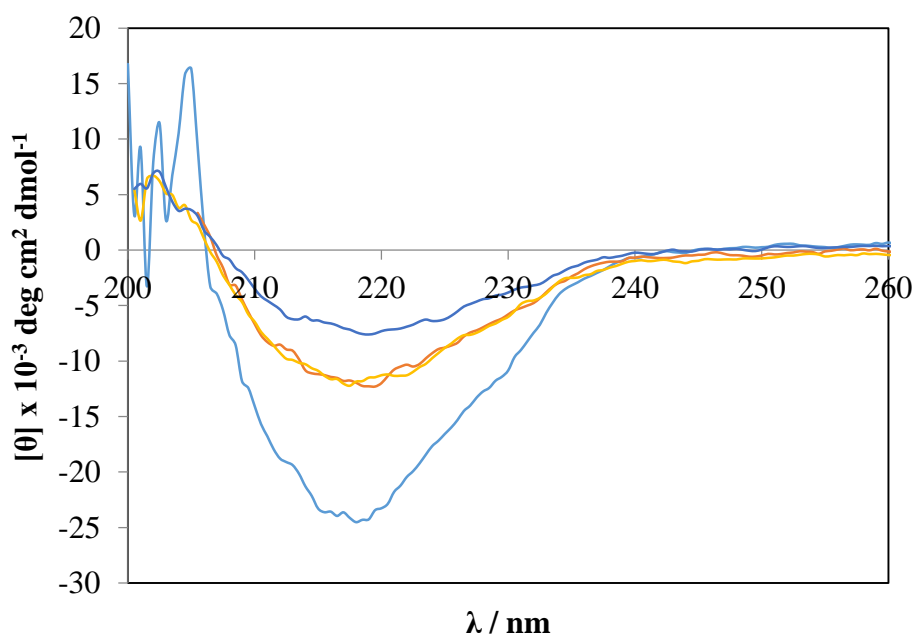


Figura 31 - Espectro de DC da IgY em soluções de sais: fosfato de sódio 5% (—), sulfato de sódio 5% (—) e 10% (—), utilizando como controle a IgY em PBS (—).

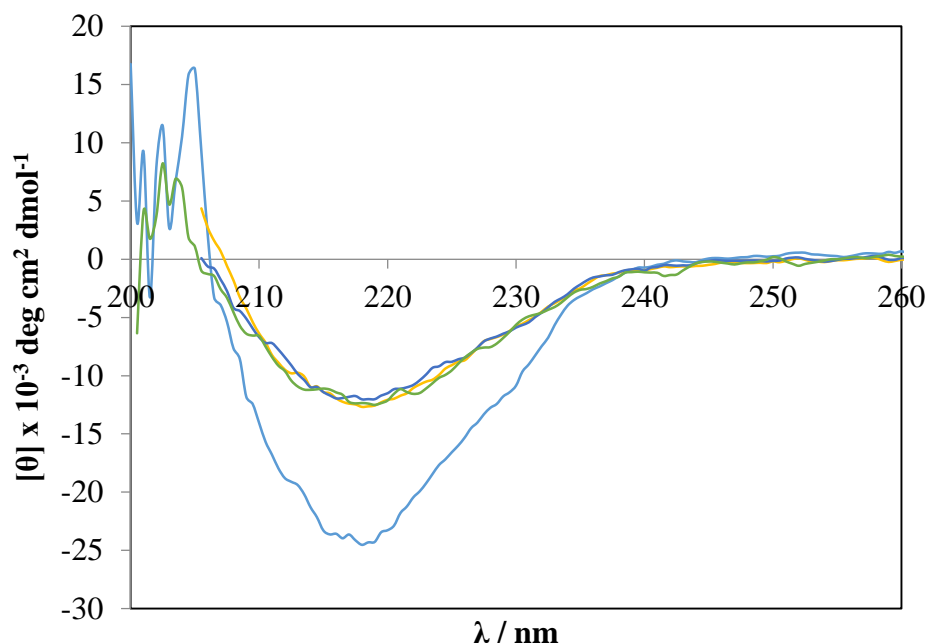


Figura 32 - Espectro de DC da IgY em soluções de $[N_{4444}]Cl$ 5% (—), 15% (—) e 25% (—), utilizando como controlo a IgY em PBS (—).

Os espectros da IgY nas soluções aquosas de polímeros, sais e LIs apresentam um comportamento semelhante. Verifica-se uma deflexão negativa na região dos 210-230 nm, em particular aos 218 nm, como resultado da contribuição de folhas β na estrutura secundária da IgY [109]. Os espectros de DC da IgY nas soluções de polímeros, sais e LIs obtidos neste trabalho são bastante semelhantes ao que se verifica na literatura para a IgY em tampão fosfato [39]. A IgY nas várias soluções estudadas apresenta uma intensidade de sinal inferior relativamente ao sinal da IgY em PBS, uma vez que a IgY em PBS se encontrava com o dobro da concentração relativamente à IgY presente nas soluções de polímeros, sais e LIs. Contudo, destaca-se o sinal da IgY em sulfato de sódio a 10% que apresenta intensidade inferior relativamente à IgY nas outras soluções. Visto que a concentração de IgY nas várias soluções é a mesma, pode ter ocorrido desenovelamento conformacional da IgY, culminando numa perda de estrutura secundária da proteína neste sal, pelo que a intensidade do sinal a 218 nm diminuiria. No entanto, é mais provável que tenha ocorrido precipitação da IgY, uma vez que este sal é um agente “*salting out*” e consequentemente a concentração da IgY na solução e a intensidade do sinal da IgY diminuem.

Em geral, conclui-se que os polímeros, o fosfato de sódio, o sulfato de sódio e o

[N₄₄₄₄]Cl, nas concentrações estudadas, não contribuem para que ocorram alterações na estrutura secundária do anticorpo. Contudo, esta preservação não é garantida durante longos períodos de tempo, uma vez a medição ocorreu aquando da adição do anticorpo às soluções aquosas. É ainda de referir que o sulfato de sódio a 10% poderá contribuir para que ocorram alterações que induzam a perda da estrutura secundária da IgY, o que deve ser avaliado em maior detalhe.

Embora a estrutura secundária da IgY se tenha preservado, nos resultados de *Western Blot* da IgY em 12,5% PEG 200, 12,5% [Ch][Ac] e 12,5% [Ch][HEPES] verificam-se bandas inespecíficas a um peso molecular elevado que podem advir de processos de agregação da IgY ou de interações entre o anticorpo e o LI. Os resultados de *Western Blot* da IgY nas soluções de sais não revelam bandas inespecíficas a elevados pesos moleculares, no entanto os resultados de ELISA evidenciam uma menor atividade do anticorpo face às soluções aquosas de polímeros. Do mesmo modo, os resultados de ELISA da IgY em soluções de LIs revelam também uma menor atividade face às soluções aquosas de polímeros, que pode resultar da perda de atividade da cadeia leve da IgY (demonstrada por *Western Blot*). É de particular interesse compreender os efeitos dos LIs nas proteínas, uma vez que atualmente são candidatos promissores na constituição de SABs. O resumo dos resultados obtidos nesta secção encontra-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Resumo dos resultados obtidos no âmbito da avaliação da atividade e estabilidade da IgY em soluções de polímeros, sais e LIs.

Constituinte da solução aquosa	<i>Western Blot</i>	ELISA	Dicroísmo Circular
PPG 400	IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 6,74-11,40 ng/mL	A estrutura secundária da IgY é preservada
PEG 200	IgY é reconhecida, embora se tenha verificado uma banda inespecífica a um elevado peso molecular	IgY reconhecida numa concentração de 6,36-10,90 ng/mL	A estrutura secundária da IgY é preservada
PEG 400	IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 6,77-10,16 ng/mL	A estrutura secundária da IgY é preservada
PEG 600	IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 7,67-12,54 ng/mL	A estrutura secundária da IgY é preservada
Cloreto de sódio	IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 7,06 ng/mL	---
Sulfato de sódio	IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 9,14-11,02 ng/mL	A estrutura secundária da IgY é preservada, embora a 20% se apresente um sinal inferior que pode dever-se a precipitação ou a uma perda efetiva de estrutura secundária da IgY
Carbonato de sódio	IgY não preserva a sua atividade	IgY apenas reconhecida numa concentração de 2,71 ng/mL	---
Citrato de sódio	IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 8,47 e 8,69 ng/mL	---
Fosfato de sódio	IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 5,88 ng/mL	A estrutura secundária da IgY é preservada

Tabela 12 (Continuação) - Resumo dos resultados obtidos no âmbito da avaliação da atividade e estabilidade da IgY em soluções de polímeros, sais e LIs.

Constituinte da solução aquosa	Western Blot	ELISA	Dicroísmo Circular
[Ch][MES]	A cadeia pesada da IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 4,45-6,41 ng/mL	---
[Ch][TES]	A cadeia pesada da IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 3,73-6,15 ng/mL	---
[Ch][Tricine]	A cadeia pesada da IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 3,24-5,67 ng/mL	---
[Ch][HEPES]	A cadeia pesada da IgY é reconhecida e verificou-se uma banda inespecífica a um elevado peso molecular	IgY reconhecida numa concentração de 3,74-7,29 ng/mL	---
[C ₄ mim]Cl	A cadeia pesada da IgY é reconhecida	IgY reconhecida numa concentração de 3,21-5,93 ng/mL	---
[C ₄ mim][CF ₃ SO ₃]	A cadeia pesada da IgY é reconhecida	---	---
[Ch][Ac]	A cadeia pesada da IgY é reconhecida e verificou-se uma banda inespecífica a um elevado peso molecular	IgY reconhecida numa concentração de 3,62-5,85 ng/mL	---
[N ₄₄₄]Cl	Precipita o tampão de amostra	IgY reconhecida numa concentração de 2,52-5,75 ng/mL	A estrutura secundária da IgY é preservada

3.3. Conclusões

Sintetizaram-se [Ch][GB]-LIs para que juntamente com o polímero PPG 400 se formassem SABs de modo a purificar a IgY. Nestes sistemas, e de acordo com o pH das fases, o anticorpo encontrava-se carregado negativamente e migrou preferencialmente para a fase de LI (fase inferior dos sistemas), resultando em valores de EE_{IgY} satisfatórias. No entanto, as proteínas contaminantes, α - e β -livetina, migraram também preferencialmente para a mesma fase o que não permitiu obter um elevado grau de pureza do processo. A IgY e as demais proteínas encontravam-se maioritariamente na fase inferior dos SABs, o que pode ser explicado pelo carácter mais hidrofílico dos LIs face ao polímero e por uma possível interação entre os resíduos negativamente carregados da IgY com o catião dos LIs. Dos pontos de mistura estudados inicialmente (7-10 % [Ch][GB]-LIs, 50 % PPG 400 e 40-43 % FPSA), verificou-se que os melhores resultados decorriam da utilização de [Ch][TES] e [Ch][Tricine]. Com a utilização destes LIs obtiveram-se rendimentos de IgY na ordem dos 80 % com eficiências de extração de cerca de 90 %, embora os fatores de pureza sejam

apenas de 27 %. Após a optimização com 10-20 % [Ch][TES], o rendimento de IgY na fase inferior variou entre 67 – 95 % e a pureza não ultrapassou os 35%, não se tendo verificado melhorias significativas no processo de purificação de IgY. Procedeu-se então à variação da fração mássica de [Ch][TES] e PPG 400 ao longo da região bifásica (10 e 16 % [Ch][TES], 30 – 45 % PPG 400 e 39 – 54 % FPSA), que permitiu obter fatores de pureza de 44 %, obtendo-se ainda rendimentos de IgY entre 55 – 85 %. Conclui-se assim que dos pontos de mistura estudados, o mais promissor no âmbito na purificação da IgY é constituído por 16 % [Ch][TES], 45 % PPG 400 e 39 % FPSA, obtendo-se um rendimento de IgY na fase inferior de 85 % com 44 % de pureza. Tendo em conta que num único passo se consegue obter uma quantidade considerável de anticorpo, a utilização de SABs no contexto da recuperação da IgY é promissora. Contudo, será necessário aumentar o grau de pureza para que a IgY possa ser utilizada como um biofármaco e será importante avaliar a atividade e estabilidade do anticorpo.

Para avaliar se os SABs constituídos por combinações de polímeros, sais e LIs comprometem a atividade e estabilidade da IgY realizou-se *Western Blot*, ELISA, DC e monitorizou-se o comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção da IgY. Relativamente à atividade do anticorpo, esta foi preservada em todas as soluções, excepto na presença de carbonato de sódio. Embora ocorra a preservação da atividade, pelos resultados de *Western Blot* verifica-se que é possível que resultem processos de instabilidade como a agregação. Foi ainda observado nos resultados de ELISA que a preservação da atividade da IgY nas soluções de polímeros, sais e LIs não é equiparável, uma vez que se verificou que os polímeros estão associados a um maior reconhecimento da IgY, seguidos dos sais e LIs. Nestes últimos, a atividade da IgY decresce e pode comprometer a sua utilização como biofármaco. Foi também notável que a atividade da IgY diminui com o aumento da concentração de polímero ou LI. A estrutura secundária da IgY nas soluções analisadas preservou-se maioritariamente em folhas β . Desta forma, conclui-se que a estrutura secundária da proteína não é afetada, embora possam ocorrer alterações na imunoreatividade do anticorpo nas diferentes soluções aquosas. Tendo em conta os resultados do estudo da atividade e estabilidade da IgY nas soluções de polímeros, sais e LIs e os resultados obtidos no âmbito da purificação da IgY através de SABs, um sistema que poderia ser promissor seria constituído por PEG + sal ou PPG + sal, utilizando LIs em baixas concentrações como adjuvantes.

4. Considerações finais

O objetivo desta dissertação de mestrado consistiu no estudo da purificação da IgY a partir da gema do ovo através de SABs. Os SABs são atualmente considerados uma técnica promissora no âmbito da extração e purificação de biomoléculas, uma vez que apresentam várias vantagens, nomeadamente a sua elevada quantidade em água e facilidade de aplicação do processo em larga escala. Atualmente, 50 µg de IgY pura apresenta um elevado custo (cerca de 300€), daí a necessidade de se desenvolverem novas plataformas de purificação mais económicas e eficientes. Neste sentido, utilizaram-se SABs constituídos por LIs que conferem um meio de pH controlado para as proteínas (constituídos pelo catião colínio e por aniões de derivados zwitteriónicos com capacidade tampão, os *Good's Buffers* (GBs)), e por um polímero biodegradável e biocompatível (PPG). No âmbito da purificação da IgY com SABs constituídos por [Ch][GB]-LIs e PPG 400, dever-se-ia avaliar o efeito do carácter termosensível do PPG, uma vez que com o aumento da temperatura o polímero torna-se mais hidrofóbico contribuindo para que ocorra uma diminuição das proteínas de natureza hidrofílica na fase superior dos SABs. Poder-se-ia também substituir o polímero PPG por PEG, uma vez que o PEG é mais hidrofílico e poderia contribuir para que ocorresse um aumento da migração de proteínas contaminantes para a fase superior enriquecida em polímero. Como trabalho futuro seria importante a definição de novos pontos de extração com [Ch][Tricine], [Ch][HEPES] e [Ch][MES] para tentar otimizar os resultados com estes LIs. Seria também pertinente a realização de novos ciclos de purificação a partir da fase inferior dos SABs para tentar remover as proteínas contaminantes e aumentar assim o grau de pureza. Uma abordagem posterior passaria por recuperar a IgY com um elevado grau de pureza das fases inferiores através da remoção do LI por diálise.

Relativamente à avaliação da atividade e estabilidade da IgY, seria importante a realização dos estudos em concentrações superiores de polímeros, sais e LIs. Para complementar os resultados obtidos, seria conveniente a avaliação através de outras técnicas, nomeadamente Calorimetria Diferencial de Varrimento e Ensaio de deslocamento térmico de proteínas, que nos permitem inferir sobre a estabilidade da proteína com base na desnaturação térmica da IgY. Poder-se-ia analisar a homogeneidade das amostras por *Dynamic light scattering*, para avaliar a possível presença de agregados. Seria ainda útil a análise das amostras por DC após 24 horas de contacto da IgY com as várias soluções para tentar compreender se ocorrem alterações na estrutura secundária após um maior período de tempo. Relativamente às amostras de IgY na presença de LIs com colina ou imidazólios,

seria plausível a realização de diálise para remover o LI e proceder-se posteriormente à análise por DC para se conseguir informação do efeito destes LIs na estrutura secundária da IgY. Poder-se-ia ainda complementar a análise da estrutura secundária por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

5. Referências

1. Casadevall A, Scharff MD. Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clinical infectious diseases*. 1995;21(1):150–61.
2. Sepkowitz KA, Telzak EE, Recalde S, Armstrong D. Trends in the susceptibility of tuberculosis in New York City, 1987-1991. *Clinical infectious diseases*. 1994;18(5):755–9.
3. Rader RA. (Re)defining biopharmaceutical. *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group; 2008;26(7):743–51.
4. Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Aires-Barros MR. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends in biotechnology*. Elsevier; 2009;27(4):240–7.
5. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2007;96(1):1–26.
6. Rosa PAJ, Ferreira IF, Azevedo AM, Aires-Barros MR. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of chromatography A*. 2010;1217(16):2296–305.
7. Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjöquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clinical chemistry*. 1991;37(3):411–4.
8. Larsson A, Sjöquist J. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. *Journal of immunological methods*. 1988;108(1-2):205–8.
9. Larsson A, Wejåker PE, Forsberg PO, Lindahl T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *Journal of immunological methods*. 1992;156(1):79–83.
10. Freire MG, Cláudio AFM, Araújo JMM, Coutinho JAP, Marrucho IM, Canongia Lopes JN, Rebelo LPN. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chemical Society reviews*. 2012;41(14):4966–95.
11. Hatti-Kaul R. Aqueous two-phase systems. A general overview. *Molecular biotechnology*. 2001;19(3):269–77.
12. Kovacs-Nolan J, Mine Y. Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian and poultry biology reviews*. 2004;15(1).
13. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*. 2005;46(3):258–68.
14. O’Farrelly C, Branton D, Wanke CA. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. *Infection and immunity*. 1992;60(7):2593–7.
15. Peralta RC, Yokoyama H, Ikemori Y, Kuroki M, Kodama Y. Passive immunisation against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg-yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *Journal of medical microbiology*. 1994;41(1):29–35.
16. Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, Sando S, Ikemori Y, Kodama Y. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infection and immunity*. 1992;60(3):998–1007.
17. Gürtler M, Methner U, Kobilke H, Fehlhaber K. Effect of orally administered egg yolk antibodies on *Salmonella enteritidis* contamination of hen’s eggs. *Journal of veterinary medicine*. 2004;51(3):129–34.

18. Nilsson E, Larsson A, Olesen H V, Wejåker P-E, Kollberg H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatric pulmonology*. 2008;43(9):892–9.
19. Carlander D, Kollberg H, Wejåker PE, Larsson A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunologic research*. 2000;21(1):1–6.
20. Kovacs-Nolan J, Mine Y. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. *Journal of immunological methods*. 2005;296(1-2):199–209.
21. Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR Journal*. 1995;37(3):93–118.
22. Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, Larsson A, Pollmann W, Regenmortel M van, Rijke E, Spielmann H, Steinbusch H, Straughan D. The production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. *ATLA*. 1996;24:925–34.
23. Polson A, von Wechmar MB, van Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunological communications*. 1980;9(5):475–93.
24. Kim M, Higashiguchi S, Iwamoto Y, Yang H-C, Cho H-Y, Hatta H. Egg Yolk antibody and its application. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2000;5(2):79–83.
25. Rose ME, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European journal of immunology*. 1974;4(7):521–3.
26. Tressler RL, Roth TF. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(32):15406–12.
27. Bartz CR, Conklin RH, Tunstall CB, Steele JH. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. *The Journal of infectious diseases*. 1980;142(3):439–41.
28. Kuroki M, Ikemori Y, Yokoyama H, Peralta RC, Icatlo FC, Kodama Y. Passive protection against bovine rotavirus-induced diarrhea in murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Veterinary microbiology*. 1993;37(1-2):135–46.
29. Kuroki M, Ohta M, Ikemori Y, Icatlo FC, Kobayashi C, Yokoyama H, Kodama Y. Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves. *Archives of virology*. 1997;142(4):843–51.
30. Ikemori Y, Ohta M, Umeda K, Icatlo FC, Kuroki M, Yokoyama H, Kodama Y. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Veterinary Microbiology*. 1997;58(2-4):105–11.
31. Lee SB, Mine Y, Stevenson RM. Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(1):110–5.
32. Noack F, Helmecke D, Rosenberg R, Thorban S, Nekarda H, Fink U, Lewald J, Stich M, Schutze K, Harbeck N, Magdolen V, Graeff H, Schmitt M. CD87-positive tumor cells in bone marrow aspirates identified by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *International Journal of Oncology*. Spandidos Publications; 1999;15(4):617–40.
33. Lemamy GJ, Roger P, Mani JC, Robert M, Rochefort H, Brouillet JP. High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. *International journal of cancer*. 1999;80(6):896–

902.

34. Al-Haddad S, Zhang Z, Leygue E, Snell L, Huang A, Niu Y, Hiller-Hitchcock T, Hole K, Murphy LC, Watson PH. Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer. *The American journal of pathology*. 1999;155(6):2057–66.
35. Döller PC, Döller G, Gerth HJ. Subtype-specific identification of influenza virus in cell cultures with FITC labelled egg yolk antibodies. *Medical microbiology and immunology*. 1987;176(1):27–35.
36. Fertel R, Yetiv JZ, Coleman MA, Schwarz RD, Greenwald JE, Bianchine JR. Formation of antibodies to prostaglandins in the yolk of chicken eggs. *Biochemical and biophysical research communications*. 1981;102(3):1028–33.
37. Zouali M. *Antibodies*. ELS. John Wiley & Sons, Ltd; 2010.
38. Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology today*. 1995;16(8):392–8.
39. Shimizu M, Nagashima H, Sano K, Hashimoto K, Ozeki M, Tsuda K, Hatta H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1992;56(2):270–4.
40. Dávalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D, Hidalgo-Alvarez R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2000;11(6):657–73.
41. Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1993;57(3):450–4.
42. Shimizu M, Fitzsimmons RC, Nakai S. Anti-E. coli Immunoglobulin Y Isolated from Egg Yolk of Immunized Chickens as a Potential Food Ingredient. *Journal of Food Science*. 1988;53(5):1360–8.
43. Carlander D, Ståhlberg J, Larsson A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Upsala journal of medical sciences*. 1999;104(3):179–89.
44. Larsson A, Bålöw RM, Lindahl TL, Forsberg PO. Chicken antibodies: taking advantage of evolution-a review. *Poultry science*. 1993;72(10):1807–12.
45. Raja S, Murty VR, Thivaharan V, Rajasekar V, Ramesh V. *Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review*. Vol. 1, Science and Technology. Scientific & Academic Publishing; 2011. p. 7–16.
46. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. *Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation*. Pharmaceutical Research. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers; 2003;20(9):1325–36.
47. Demeule B, Gurny R, Arvinte T. Where disease pathogenesis meets protein formulation: renal deposition of immunoglobulin aggregates. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. 2006;62(2):121–30.
48. Mahler H-C, Friess W, Grauschopf U, Kiese S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2009;98(9):2909–34.
49. Arakawa T, Timasheff SN. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*. 1982;21(25):6536–44.
50. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*.

2006;1(6):2876–90.

51. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1751(2):119–39.
52. Pinho Melo E, Aires-Barros MR, Costa SMB, Cabral JMS. Thermal unfolding of proteins at high pH range studied by UV absorbance. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1997;34(1):45–59.
53. McLaren RD, Prosser CG, Grieve RCJ, Borissenko M. The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunised with ovine α -lactalbumin. *Journal of Immunological Methods*. 1994;177(1-2):175–84.
54. Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification. *Journal of Food Science*. 1992;57(3):629–34.
55. Szenczi A, Kardos J, Medgyesi GA, Závodszy P. The effect of solvent environment on the conformation and stability of human polyclonal IgG in solution. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*. 2006;34(1):5–14.
56. Paborji M, Pochopin NL, Coppola WP, Bogardus JB. Chemical and physical stability of chimeric L6, a mouse-human monoclonal antibody. *Pharmaceutical research*. 1994;11(5):764–71.
57. Usami A, Ohtsu A, Takahama S, Fujii T. The effect of pH, hydrogen peroxide and temperature on the stability of human monoclonal antibody. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1996;14(8-10):1133–40.
58. Desai RK, Streefland M, Wijffels RH, Eppink MHM. Extraction and stability of selected proteins in ionic liquid based aqueous two phase systems. *Green Chemistry. The Royal Society of Chemistry*; 2014;16(5):2670–9.
59. Shimizu M, Nagashima H, Hashimoto K, Suzuki T. Egg Yolk Antibody (Ig Y) Stability in Aqueous Solution with High Sugar Concentrations. *Journal of Food Science*. 1994;59(4):763–5.
60. Guidelines for assuring the quality of monoclonal antibodies for use in humans. WHO Technical Report Series. 1992;822:47–68.
61. Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *Journal of immunological methods*. 1981;46(1):63–8.
62. Vieira JG, Oliveria MA, Russo EM, Maciel RM, Pereira AB. Egg yolk as a source of antibodies for human parathyroid hormone (hPTH) radioimmunoassay. *Journal of immunoassay*. 1984;5(1-2):121–9.
63. Hatta H, Kim M, Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, “IgY”. *Agricultural and biological chemistry*. 1990;54(10):2531–5.
64. Chang HM, Lu TC, Chen CC, Tu YY, Hwang JY. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(4):995–9.
65. Hassl A, Aspöck H. Purification of egg yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *Journal of immunological methods*. 1988;110(2):225–8.
66. Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *Journal of Immunological Methods*. 1998;215(1-2):1–7.
67. Polson A, Coetzer T, Kruger J, von Maltzahn E, van der Merwe KJ. Improvements in the isolation of IgY

- from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunological investigations*. 1985;14(4):323–7.
68. Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunological investigations*. 1990;19(3):253–8.
 69. Bade H, Stegemann H. Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk. *Journal of immunological methods*. 1984;72(2):421–6.
 70. England S, Seifter S. Precipitation techniques. *Methods in enzymology*. 1990;182:285–300.
 71. Janson J-C. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. 3rd ed. Wiley; 2011.
 72. Burgess RR. Protein precipitation techniques. *Methods in enzymology*. 2009;463:331–42.
 73. Martin WG, Vandegaer JE, Cook WH. Fractionation of livetin and the molecular weights of the alpha- and beta-components. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1957;35(4):241–50.
 74. Deignan T, Kelly J, Alwan A, O'Farrelly C. Comparative Analysis of Methods of Purification of Egg Yolk Immunoglobulin. *Food and Agricultural Immunology*. Taylor & Francis Group; 2000;12(1).
 75. Bizhanov G, Vyshniauskis G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Veterinary research communications*. 2000;24(2):103–13.
 76. Tan SH, Mohamedali A, Kapur A, Lukjanenko L, Baker MS. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. *Journal of immunological methods*. 2012;380(1-2):73–6.
 77. EGGcellent. Pierce™ Chicken IgY Purification Kit [Internet]. Thermo Fisher Scientific. [cited 2015 Nov 23]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/44918>
 78. EGGstract. Life science catalog [Internet]. Promega. 2010 [cited 2015 Nov 23]. Available from: <http://www.promega.co.jp/cat/2010UScat.pdf>
 79. Ståhlberg J, Larsson A. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. *Uppsala journal of medical sciences*. 2001;106(2):99–110.
 80. Polson A, von Wechmar MB, Fazakerley G. Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. *Immunological communications*. 1980;9(5):495–514.
 81. Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods*. 1993;160(2):207–14.
 82. Müller E, Berger R, Blass E, Sluyts D, Pfenning A. *Liquid–Liquid Extraction*. Wiley-VCH; 2000.
 83. Albertsson PA. Partition of Cell Particles and Macromolecules. *Trends in Biochemical Sciences*. 1986;3(2).
 84. Sinha R, Singh SP, Ahmed S, Garg SK. Partitioning of a *Bacillus* alkaline protease in aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*. 1996;55(2):163–6.
 85. Passos H, Sousa ACA, Pastorinho MR, Nogueira AJA, Rebelo LPN, Coutinho JAP, Freire MG. Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems for improved detection of bisphenol A in human fluids. *Analytical Methods*. The Royal Society of Chemistry; 2012;4(9):2664.
 86. Khimji I, Doan K, Bruggeman K, Huang P-JJ, Vajha P, Liu J. Extraction of DNA staining dyes from DNA using hydrophobic ionic liquids. *Chemical communications*. The Royal Society of Chemistry; 2013;49(40):4537–9.

87. Gutowski KE, Broker GA, Willauer HD, Huddleston JG, Swatloski RP, Holbrey JD, Rogers RD. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society; 2003;125(22):6632–3.
88. Taha M, E Silva FA, Quental M V, Ventura SPM, Freire MG, Coutinho JAP. Good's buffers as a basis for developing self-buffering and biocompatible ionic liquids for biological research. *Green chemistry*. The Royal Society of Chemistry; 2015;16(6):3149–59.
89. Taha M, Almeida MR, Silva FAE, Domingues P, Ventura SPM, Coutinho JAP, Freire MG. Novel biocompatible and self-buffering ionic liquids for biopharmaceutical applications. *Chemistry*. 2015;21(12):4781–8.
90. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*. American Chemical Society; 1966;5(2):467–77.
91. Liu J, Yang J, Xu H, Lu J, Cui Z. A new membrane based process to isolate immunoglobulin from chicken egg yolk. *Food Chemistry*. 2010;122(3):747–52.
92. Merchuk JC, Andrews BA, Asenjo JA. Aqueous two-phase systems for protein separation. Studies on phase inversion. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 1998;711(1-2):285–93.
93. Amado F, Domingues MR, Domingues P, Ferreira R, Vitorino R. *Análise de Proteínas - Guia do Laboratório*. 100 Luz; 2013.
94. Bernardi G, Cook WH. An electrophoretic and ultracentrifugal study on the proteins of the high density fraction of egg yolk. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1960;44:86–96.
95. Lee SY, Vicente FA, e Silva FA, Sintra TE, Taha M, Khoiroh I, Coutinho JAP, Show PL, Ventura SPM. Evaluating Self-buffering Ionic Liquids for Biotechnological Applications. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. American Chemical Society; 2015;3(12):3420–8.
96. Knoll D, Hermans J. Polymer-protein interactions. Comparison of experiment and excluded volume theory. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258(9):5710–5.
97. Knoll DA, Hermans J. Effect of poly(ethylene glycol) on protein denaturation and model compound pKa's. *Biopolymers*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1981;20(8):1747–50.
98. Hofmeister F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1888;24:247–60.
99. Zhao H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2015;85(7):891–907.
100. Grossfield A, Ren P, Ponder JW. Ion solvation thermodynamics from simulation with a polarizable force field. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(50):15671–82.
101. Schneider CP, Shukla D, Trout BL. Arginine and the Hofmeister Series: The Role of Ion–Ion Interactions in Protein Aggregation Suppression. *The Journal of Physical Chemistry B*. American Chemical Society; 2011;115(22):7447–58.
102. Zhang Y, Cremer PS. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. Vol. 10, *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006. p. 658–63.
103. Tomé LIN, Jorge M, Gomes JRB, Coutinho JAP. Molecular Dynamics Simulation Studies of the

Interactions between Ionic Liquids and Amino Acids in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*. American Chemical Society; 2012;116(6):1831–42.

104. Yang Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal of biotechnology*. 2009;144(1):12–22.

105. Tietze AA, Bordusa F, Giernoth R, Imhof D, Lenzer T, Maass A, Mrestani-Klaus C, Neundorff I, Oum K, Reith D, Stark A. On the nature of interactions between ionic liquids and small amino-acid-based biomolecules. *Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry*. 2013;14(18):4044–64.

106. Cao Q, Quan L, He C, Li N, Li K, Liu F. Partition of horseradish peroxidase with maintained activity in aqueous biphasic system based on ionic liquid. *Talanta*. 2008;77(1):160–5.

107. Taha M, Quental M V, Correia I, Freire MG, Coutinho JAP. Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids. *Process Biochemistry*. 2015;50(7):1158–66.

108. *Spectrophotometry Handbook*. GE Healthcare; 2012.

109. Ulrichs T, Drotleff AM, Ternes W. Determination of heat-induced changes in the protein secondary structure of reconstituted livetins (water-soluble proteins from hen's egg yolk) by FTIR. *Food chemistry*. 2015;172:909–20.